

**Versuche zur Identifizierung und
Charakterisierung von Bovinen
Herpesvirus Typ 1 (BHV 1) -isolaten**

Thomas Graf

Disbui. München

1989

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der
Tiere, Tübingen

Betreuer: Prof. Dr. O. C. Straub

vorgelegt über das
Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenlehre der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

VERSUCHE ZUR IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON
BOVINEN HERPESVIRUS TYP 1 (BHV1) -ISOLATEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Thomas Graf
aus
Burglengenfeld

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Ziel der Arbeit	1
2. Literatur	3
2.1. BHV1	3
2.2. Geschichtliches	3
2.3. Epizootologie und Pathogenese	4
2.4. Klinisches Bild	4
2.5. Immunologie, Diagnosestellung und Differentialdiagnose	5
2.6. Bekämpfung, insbesondere an Besamungsstationen	6
2.7. Virusausscheidung	7
2.8. Latenz und Möglichkeiten der Reaktivierung des Virus	8
2.9. Bisherige Versuche zur Differenzierung von BHV1-Stämmen	10
3. Materialien und Methoden	13
3.1. Materialien	13
3.1.1. Versuchstiere	13
3.1.2. Virusisolate und Virusstämme	13
3.1.2.1. Virusisolate aus Tupferproben der Besamungsbullen	13
3.1.2.2. BHV1-Stämme	13
3.1.2.3. Gewebekulturpassagen des BHV1-Stammes BFA 4	14
3.1.2.4. Virusisolate aus Tupferproben von BFA-Rindern	15
3.1.3. Zellen, Medien und Kulturbedingungen	15
3.1.4. Lösungen und Puffer	16
3.1.5. Chemikalien	19
3.1.6. Weitere Materialien	20
3.1.7. Die Gensonde pEO	21

	Seite
3.2. Methoden	22
3.2.1. Zellzucht	22
3.2.2. Virusanzüchtung	22
3.2.3. Immunsuppression	22
3.2.4. Tupferentnahme und Tupferaufarbeitung	23
3.2.5. Serumneutralisationstest	23
3.2.6. Virusidentifizierung mittels Hyper- immunserum	24
3.2.7. Virusreinigung	25
3.2.8. Agarose Gelelektrophorese und Southern -blot-Hybridisierung	25
3.2.8.1. Allgemeines	25
3.2.8.2. DNA-Extraktion	26
3.2.8.3. DNA-Restriktion	26
3.2.8.4. Agarose Gelelektrophorese	27
3.2.8.5. DNA-Transfer auf Nitrozellulosefilter	27
3.2.8.6. Radioaktive Markierung der Gensonde mittels Multipriming	28
3.2.8.7. Hybridisierung und Autoradiographie	28
4. Ergebnisse	29
4.1. Virusidentifizierungen	29
4.1.1. Auswertung der Vorversuche	29
4.1.2. Ergebnisse der Virusdifferenzierungen	32
4.2. BHV1-Ausscheidung von BFA-Rindern nach Immunsuppression	33
4.3. Restriktionsmuster nach Southern-blot -Hybridisierung	35
4.3.1. Restriktionsmuster der BHV1-Isolate aus Tupferproben der Besamungsbullen	35
4.3.2. Restriktionsmuster verschiedener BHV1-Stämme	36
4.3.3. Restriktionsmuster verschiedener Gewebe- kulturpassagen des BHV1-Stammes BFA 4	36
4.3.4. Restriktionsmuster zweier BHV1-Stämme nach Tierpassagen	37

	Seite
5. Diskussion	43
5.1. BHV1-Immunstatus und BHV1-Latenz bei Besamungsbullen	43
5.2. Immunsuppression der BFA-Rinder	45
5.3. Charakterisierung der BHV1-Isolate	46
6. Zusammenfassung	50
7. Summary	52
8. Literaturverzeichnis	54



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung und Ziel der Arbeit

Das Bovine Herpesvirus Typ 1 (BHV1) ist der Erreger der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis (IBR), Infektiösen Pustulösen Vulvovaginitis (IPV) und der Infektiösen Balanoposthitis (IBP). Darüber hinaus ist BHV1 als Abortursache von wirtschaftlicher Bedeutung und wurde auch bei Konjunktivitis, Metritis, Mastitis, Dermatitis und Läsionen im Zwischenklauenspalt sowie bei Kälbern mit Enzephalitis und Enteritis nachgewiesen (61,78).

Neben den klinisch apparenten Verlaufsformen gibt es jedoch häufig klinisch inapparente, latente Infektionen. Wie bei nahezu allen Herpesviren führt auch die Infektion mit BHV1 gewöhnlich zu einer lebenslangen Persistenz des Erregers im Organismus (34,35).

Besonders gefährdet durch BHV1-Infektionen sind Besamungsstationen, nicht nur durch die im Krankheitsfall direkt bei den Tieren auftretenden Schäden, sondern auch wegen großer wirtschaftlicher Verluste durch Handelsbeschränkungen und Quarantänemaßnahmen.

Auf der anderen Seite geht jedoch gerade von Besamungsstationen eine nicht zu unterschätzende Gefahr aus, da latent infizierte Bullen intermittierend Virus ausscheiden können (17,72). Durch die Versendung infizierten Samens ist die Verbreitung des Virus auch über große Entfernungen möglich, und in kontaminierten Samenportionen ist das Virus über einen langen Zeitraum konserviert (9). Infizierter Samen kann bei der Kuh zu Fruchtbarkeitsstörungen, Aborten und nekrotisierender Endometritis führen (34), insbesondere dann, wenn die Haltungsbedingungen nicht optimal sind (76).

An einer Besamungsstation wurden deshalb in Zusammenarbeit mit der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFA) in Tübingen während eines Zeitraumes von 2 Jahren alle neueingestellten Jungbullen und alle aus Wartebullenhaltungen zurückgekehrten Altbullen auf ihren BHV1-Immunstatus und mittels Tupferproben auf Virusaus-

scheidung nach Immunsuppression untersucht. An dieser Besamungsstation war jahrelang mit attenuiertem Impfstoff gegen IBR/IBP geimpft worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aus Nasen- und Präputialtupfern isoliertes Virus zu identifizieren und die BHV1-Isolate mittels einer Gensonde näher zu charakterisieren.

Weiterhin wurde geprüft, ob sich diese Gensonde zur Differenzierung von BHV1-Stämmen eignet.

2. Literatur

2.1. BHV1

Das Bovine Herpesvirus Typ 1 gehört zur Subfamilie der Alphaherpesvirinae, ist behüllt und antigenetisch einheitlich. Sein Gesamtdurchmesser beträgt ca. 200 nm, seine Dichte in Cäsiumchlorid liegt zwischen 1,27 und 1,29 g/ml (31).

BHV1 besteht aus einem ikosaedrischen Nukleokapsid von etwa 95-110 nm Größe mit 162 Kapsomeren umgeben von der doppelschichtigen Lipoproteinhülle. Die äußere, mit Projektionen besetzte Hüllschicht stammt von der Kern- oder Zytoplasmamembran, die innere von der Kernmembran (61).

Im Nukleokapsid liegt die lineare, doppelsträngige DNA mit einem Molekulargewicht von 88×10^6 Dalton. Ihr Guanin/Cytosingehalt beträgt 71,5 % (30).

Bislang sind bei BHV1 mehr als 30 Strukturproteine, von denen 11 glykosyliert sind, und 15 Nichtstrukturproteine nachgewiesen (31,41).

BHV1 ist, wie alle Herpesviren, labil gegen Äther- und Chloroformbehandlung. Es wird bei 56°C/30 min oder bei pH 3 inaktiviert. Bei 37°C bleibt der Erreger etwa 10 Tage, bei -20°C ca. 2 Monate und bei -60°C mindestens 9 Monate, meist jedoch über Jahre stabil (61). Auch aus Samenportionen, die in flüssigem Stickstoff gelagert waren, kann nach Jahren noch infektiöses Virus nachgewiesen werden (9).

2.2. Geschichtliches

Die IPV ist unter dem Namen "Bläschenausschlag" bzw. Exanthema coitale vesiculosum bovis in Europa seit langem bekannt. Bereits im Jahre 1928 konnte durch Filtrationsversuche die Virusätiologie durch Reimann und Reisinger nachgewiesen werden (60).

In den fünfziger Jahren wurde in den USA erstmals über eine Viruserkrankung des Respirationstrakts bei Rindern

berichtet (67) und von Madin et al. (32) sowie McKercher et al. (36) als Infektiöse Bovine Rhinotracheitis beschrieben. In Deutschland trat die IBR erstmals 1960 auf (19).

Gillespie et al. (15) sowie McKercher et al. (37) wiesen 1959 nach, daß die IBR und die IPV von immunologisch identischen Virusstämmen verursacht werden.

1962 wurde erstmals über BHV1-Enzephalitis aus Australien berichtet (25), 1964 über BHV1 als Abortursache(39).

2.3. Epizootologie und Pathogenese

BHV1 wird in der Regel durch latent infizierte Tiere, Tiere im Inkubationsstadium oder erkrankte Tiere in einen Bestand eingeschleppt.

Die Übertragung erfolgt bei der respiratorischen Form hauptsächlich durch Tröpfcheninfektion auf aerogenem Weg, bei der genitalen Form durch gegenseitiges Belegen der Geschlechtsorgane, durch den Geschlechtsakt und kontaminierten Samen sowie mechanisch durch Schwanzschlagen oder auch Vektoren (77).

Während bei der IPV/IBP die Infektion meist lokal begrenzt bleibt und nur zu einer Entzündung von Vaginal- bzw. Präputialschleimhaut führt, kann es bei der IBR nach Vermehrung des Virus im oberen Respirationstrakt auch zu einer kurzfristigen Virämie kommen. BHV1 kann sich so auch im Uterus oder im ZNS ansiedeln (34,61,80).

2.4. Klinisches Erscheinungsbild

Die Inkubationszeit beträgt bei der respiratorischen und genitalen Verlaufsform 2 bis 6 Tage.

Bei IPV bzw. IBP beobachtet man eine Rötung und Schwellung der äußeren Genitalschleimhaut, bläschenförmige Erhebungen, Pusteln und Ulzerationen. Unruhe, Harndrang und erhöhte Deckbereitschaft sowie ein Temperaturanstieg können hinzukommen. Meist klingen die Symptome schnell ab, und es kommt zu einer völligen Wiederherstellung; jedoch werden als Spät-

folgen manchmal Sterilitäten beobachtet.

Die respiratorische Verlaufsform beginnt mit Fieber, das bis 42°C ansteigen kann. Weiterhin beobachtet man serösen Nasenausfluß, Konjunktivitis, Salivation, Hyperämie von Nasenschleimhaut und Flotzmaul, Husten und Inappetenz. Bei laktierenden Kühen kommt es zu einem schlagartigem Rückgang der Milchmenge.

Bei leichtem Krankheitsverlauf kommt es schon nach wenigen Tagen zu Besserung und schließlich Heilung, bei Hinzutreten bakterieller Sekundärinfektionen wird der Nasenausfluß eitrig, begleitet von Atemnot und Gewichtsabnahme infolge völliger Inappetenz (31,61,77,80).

Die Krankheitsdauer beträgt durchschnittlich 10 bis 14 Tage, die Morbidität bis 100 %. Die Letalität liegt zwischen 2 und 12 % und kann bei Kälbern bis 30 % ansteigen (61).

Die Meningoenzephalitis betrifft besonders Kälber im Alter von 4 bis 6 Monaten. Beobachtet werden schwankender Gang und Muskelzittern, später Salivation, Kreisbewegungen, Opisthotonus und Tremor. Die Tiere sterben nach 5 bis 7 Tagen. Hier liegt die Morbidität zwischen 5 und 25 % bei einer Letalität von 100 % (61).

Aborte durch BHV1 treten meist im 5. bis 8. Monat der Trächtigkeit auf (61).

2.5. Immunologie, Diagnosestellung und Differentialdiagnose

Nach einer Infektionen mit BHV1 kommt es zur Bildung von präzipitierenden und neutralisierenden Antikörpern sowie einer zellulären Immunität. Antikörper sind etwa ab dem 9. bis 12. Tag nach Infektion nachweisbar. Sie persistieren - je nach Nachweismethode - 5 bis 18 Monate und auch länger. Die humoralen Antikörpertiter sind in der Regel nach einer IBR höher als nach einer Infektion im Genitaltrakt (80,82).

Anhand des klinischen Bildes gelingt die Diagnosestellung nicht mit letzter Sicherheit. Differentialdiagnostisch sind bei der respiratorischen Form besonders die enzootische Bronchopneumonie und die Bovine Virusdiarrhoe, bei Abort-

fällen Listeriose, Brucellose, Trichomoniasis und Vibrionen-abort und bei der zentralnervösen Form Zerebrokortikalnekrose und sporadische Enzephalomyelitis abzugrenzen (61).

Deshalb ist zur Sicherung der Diagnose eine Laboruntersuchung fast immer unerlässlich.

Die Antikörpernachweise mittels Serumneutralisationstest oder ELISA sind sichere Methoden (13), doch können Antikörper erst nach einigen Tagen nachgewiesen werden und müssen nicht zwingend von einer Feldvirusinfektion stammen.

Die einzige Möglichkeit einer schnellen Diagnose stellt der direkte Virusnachweis aus Nasen-, Augen-, Vaginal- oder Präputialsekret, aus Samenproben oder den Organen abortierter Früchte dar. Zur Anzüchtung eignen sich besonders Kälberzellkulturen (Niere, Hoden, Lunge) (33,34).

Problematisch kann der Nachweis einer latenten Infektion sein, wenn weder eine Virusisolierung noch eine Antikörperbestimmung gelingt. Neben der zeit- und arbeitsaufwendigen medikamentellen Immunsuppression steht jedoch mit dem Intrakutantest zum Nachweis einer "delayed hyper-sensitivity" möglicherweise bald ein praxisreifes Verfahren zur Verfügung (84).

2.6. Bekämpfungsmaßnahmen, insbesondere an Besamungsstationen

Zur Bekämpfung der IBR/IPV stehen Impfstoffe aus attenuierten und inaktivierten Erregern zur Verfügung. Sie führen zwar nicht zur Eliminierung des Erregers, verhindern jedoch wirtschaftliche Schäden und die unkontrollierte Ausbreitung der Krankheit (34,35).

Lebendvakzinen führen bei lokaler Applikation immer zur Vermehrung, Ausscheidung und Latenz des Impfvirus, bei schon bestehender Infektion wird das Feldvirus nicht verdrängt (89). Gegenüber Impfstoffen aus inaktivierten Erregern besitzt die Lebendvakzine allerdings den Vorteil des besseren und schnelleren Schutzes (80,82,90).

Trotz der Erfolge bei der Bekämpfung der IBR/IPV an Besamungsstationen durch den Einsatz von Lebendimpfstoffen oder den abwechselnden Einsatz von Lebendimpfstoffen und

Impfstoffen aus inaktivierten Erregern (79,82) versucht man heute, auf die Verwendung von Lebendimpfstoffen an Besamungsstationen zu verzichten.

Die zur Zeit empfohlene Strategie im Rahmen des freiwilligen Bekämpfungsprogramms sieht den Einsatz von Lebendimpfstoffen nur in enzootisch verseuchten Beständen mit Erkrankungen vor.

Besamungsstationen sollen auf den Einsatz von Impfstoffen entweder ganz verzichten oder nur Impfstoffe aus nicht vermehrungsfähigen Erregern verwenden.

An Besamungsstationen, an denen Lebendimpfstoffe benutzt worden sind, sollen sämtliche Bullen 4 Monate nach der letzten Impfung mit vermehrungsfähigen Erregern mit monospezifischen Impfstoffen aus nicht vermehrungsfähigem BHV1-Virus immunisiert werden. Diese Impfung soll halbjährlich wiederholt werden.

Die Anwendung von Impfstoffen aus vermehrungsfähigen Erregern unterliegt in der Bundesrepublik Deutschland außerdem der Genehmigungspflicht durch die Veterinärbehörden.

2.7. Virusausscheidung

Bereits einen Tag nach Erst- oder Neuinfektion seronegativer Tiere mit BHV1 ist die Virusausscheidung an der Eintrittspforte nachweisbar. Bei der respiratorischen Verlaufsform beträgt die Dauer der Exkretion etwa 10 bis 16, bei Balanoposthitis 14 bis 22 und bei Vulvovaginitis 8 bis 14 Tage. Die maximalen Virustiter liegen bei 10^{11} KID₅₀/g Mukus.

Antikörperpositive Tiere scheiden nur zwischen 2 und 7 Tage lang Virus aus; die maximalen Virustiter bleiben hier unter den oben genannten (61,80,81).

2.8. Latenz und Möglichkeiten der Reaktivierung des Virus

Das für Herpesviren charakteristische Virus-Wirts-Verhältnis führt im Anschluß an die Infektion in der Regel zu einer lebenslangen Persistenz des Genoms des Erregers im Organismus. Phasen klinischer Manifestation mit Virusausscheidung und klinisch inapparente Phasen mit und ohne Virusausscheidung können sich abwechseln.

BHV1 gelangt über sensorische Nerven in die korrespondierenden Ganglien und von dort in die Ganglien der Gehirn- und Rückenmarksnerven, wo es sich der Körperabwehr entzieht, Identität und Vermehrungsfähigkeit jedoch behält. Daneben kann das Virus auch in Epithelzellen, lymphozytären Zellen, Makrophagen, Lymphozyten und Leukozyten persistieren.

Durch medikamentelle Immunsuppression, Bestrahlung, Zytostatika, Streß u.a.m. kann BHV1 jederzeit reaktiviert und ansteckungsfähiges Virus wieder ausgeschieden werden (34,35, 59).

Die Persistenz und Reexkretion von BHV1 unter natürlichen Bedingungen wurde bereits in den sechziger Jahren beschrieben. Snowdon (72) berichtete über intermittierende Virusausscheidung aus dem Präputium eines infizierten Bullen über den Zeitraum von 19 Monaten und aus Nase und Vagina eines Rindes bis 17 Monate nach intravenöser Infektion.

McKercher et al. (38) sowie Straub und Böhm (74) untersuchten Lokalisation und Persistenz experimentell infizierter Rinder.

Narita et al. (46,47,48,49) zeigten die Präsenz des Virusgenoms in Ganglien und Nervenfasern, Homann und Easterday (23,24) isolierten BHV1 aus Trigeminalganglien geschlachteter Rinder mittels Explantattechnik, und Ackermann und Wyler (1) wiesen durch In-situ-Hybridisierung BHV1-DNA in den Sakralganglien intravaginal infizierter Kälber nach.

Sheffy und Davies (71) sowie Davies und Duncan (10) benutzten Kortikosteroide zur Reaktivierung von latentem BHV1. Diese Methode wird bei Untersuchungen zur Latenz seitdem häufig angewandt (28,51,58) und kann auch beim

gleichen Tier mehrmals erfolgreich eingesetzt werden (48,55,58), obwohl nicht alle latent infizierten Tiere nach Immunsuppression Virus ausscheiden (59). Hierbei soll der Immunstatus des Tieres eine Rolle spielen (59), was von Straub (83) bezweifelt wird. Straub berichtete auch über die unterschiedliche Wirksamkeit verschiedener Kortisonpräparate (85).

Reaktivierung und Reexkretion von BHV1 wurde auch bei Dictyocaulus-viviparus-Befall (44), Geburtsstreß (86) und intraruminaler Verabreichung von 3-Methylindolen (14) sowie nach experimenteller Parainfluenza-3-Virus-Infektion und im Gefolge der MKS-Schutzimpfung beobachtet (42).

Straub (81) und Lena et al. (29) beobachteten Feldvirus-latenz trotz nachfolgender Impfung mit attenuiertem und/oder inaktiviertem Virus.

Auch eine Impfung vor einer Feldvirusinfektion, ob mit Lebendimpfstoff, inaktiviertem Impfstoff oder temperatur-sensitiven (ts) -Mutanten, schützt nicht vor einem Latentwerden des Feldvirus (50,62, 83).

Nettleton et al. (51) zeigten nach Lebendimpfung, Feldviruschallenge und anschließender medikamenteller Immunsuppression, daß sowohl Feld- als auch Impfvirus latent und wieder ausgeschieden werden kann. Sie verwendeten dabei einen ts-Mutantenimpfstoff.

Nach medikamenteller Immunsuppression latent infizierter Rinder sind klinische Erscheinungen meist nicht signifikant (29,56,81). Die Reexkretion erfolgt in der Regel aus dem zuvor infizierten Organtrakt (62); die Ausscheidungstitere erreichen jedoch nie dieselbe Höhe wie bei der Erstinfektion (83).

Reaktiviertes BHV1 unterscheidet sich vom Original biochemisch nicht (53,57,58). Castrucci et al. (7,8) fanden keine Pathogenitätsunterschiede, Pastoret et al. (57) keine Unterschiede in den Restriktionsenzymanalysen.

Es wurden jedoch biologische Unterschiede beobachtet (24, 54,56) und Saxegaard (64,65) berichtete, aktiviertes Virus wäre schwieriger zu isolieren, was jedoch bei den eigenen Versuchen nicht der Fall war.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Latenz das Hauptproblem der BHV1 Infektionen darstellt, begründet dadurch, daß

- wahrscheinlich alle Tiere latente Virusträger nach Infektion mit einem Feldvirusstamm werden.
- Tiere auch latente Virusträger nach Impfung mit attenuierten Impfstämmen und ts-Mutanten-Stämmen werden.
- die Impfung, ob mit attenuiertem oder inaktiviertem Virus oder mit ts-Mutanten, nicht vor einer Infektion durch einen Feldvirusstamm mit nachfolgender Latenz schützt.
- latent infizierte Tiere in der Regel nicht erkannt werden und so eine Bedrohung für den gesamten Bestand darstellen.
- latent infizierte Bullen das Virus mit dem Samen ausscheiden und so zur Verbreitung der Krankheit beitragen können (59).

2.9. Bisherige Versuche zur Differenzierung von BHV1-Stämmen

BHV1 kann eine Vielzahl von Erkrankungen auslösen (80), ist jedoch immunologisch einheitlich. So stand am Beginn der Differenzierung einzelner Stämme der Versuch, IBR- und IPV-Virusstämme zu unterscheiden.

Versuche einer Differenzierung scheiterten im Hinblick auf Morphologie (3,87), Plaquebildung (2,5) und antigene Verwandtschaft (39).

Die physiochemischen Eigenschaften der DNA verschiedener BHV1-Stämme wie Molekulargewicht, Dichte und Guanin/Cytosin-Gehalt zeigten keine Differenzen (16,30,63).

Antigene Variationen, wie zwischen Herpes-simplex Typ 1 und 2 (HSV1, HSV2) nachgewiesen (45), konnten nicht beob-

achtet werden (2,4).

Stammesspezifische Unterschiede bezüglich des Wachstums auf verschiedenen Zellkulturen und der Ausbildung eines zytopathischen Effekts wurden beschrieben (61), ebenso unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Trinatrium-Phosphonformat (Hemmer der DNA-Polymerasen) (68).

Straub et al. (75) beobachteten Abweichungen in der elektrophoretischen Mobilität der Viruspartikel einzelner Stämme.

Pastoret (57) wies drei BHV1-spezifische Polypeptide nach, die bei je drei IBR- und IPV-Virusstämmen im Molekulargewicht differierten und eine typenspezifische Zuordnung erlaubten, jedoch fand Metzler (40) Struktur- und Nichtstrukturproteine, die zwar auch Unterschiede im Molekulargewicht zeigten, aber keine typenspezifische Zuordnung zuließen.

Hayward et al. (22) gelang die Differenzierung verschiedener Herpes-simplex-Stämme mittels Restriktionsenzymanalyse. Mit dem gleichen Verfahren wiesen Engels et al. (12) Unterschiede zwischen verschiedenen genitalen und respiratorischen BHV1-Isolaten nach. Misra et al. (43) fanden ebenfalls Differenzen in den Restriktionsmustern von 93 BHV1-Isolaten, die sich jedoch nicht in Korrelation zu dem jeweiligen Krankheitsbild setzen ließen.

Mittlerweile sind alle Versuche, BHV1-Isolate aufgrund ihres klinischen Erscheinungsbildes zu unterscheiden, gescheitert, doch können Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen in den DNA und Polypeptidmustern durch Restriktionsenzymanalyse und Polyakrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen werden (6,18,40,41,52,70,88). Eine Differenzierung ist auch durch den Einsatz monoklonaler Antikörper (40) und den Tierversuch möglich (80).

Mittels Restriktionsenzymanalyse unterscheidet man heute zwischen BHV1.1, BHV1.2a, BHV1.2b, BHV1.3a und BHV1.3b. BHV1.3-Stämme besitzen ein neuropathogenetisches Potential und stammen von Kälbern mit Enzephalitis aus Australien und Argentinien (13,41,69).

Differenzen zwischen BHV1.1 und BHV1.2 (a,b) beschränken sich auf einzelne Genregionen, zwischen BHV1.3 (a,b) und den beiden anderen Stämmen findet man Unterschiede über das gesamte Genom. Die Basensequenzhomologie soll zwischen BHV1.1

und BHV1.2 (a,b) bei 95 % liegen und ähnlich hoch für BHV1.3 (a,b) sein (13,21,40,41).

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Versuchstiere

Für die Versuche zur Immunsuppression wurden sieben, mit BHV1 infizierte Rinder aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFA) in Tübingen verwendet.

3.1.2. Virusisolate und Virusstämme

3.1.2.1. Virusisolate aus Tupferproben der Besamungsbullen

Es standen insgesamt 73 Virus-positive Tupferproben von 39 Bullen zur Verfügung. 26 Bullen waren immunsupprimiert, 14 hatten spontan Virus ausgeschieden. Ein Bulle war trotz positiver Routineuntersuchung medikamentell immunsupprimiert worden.

3.1.2.2. BHV1-Stämme

Zu weiterführenden Untersuchungen fanden alle an der BFA verfügbaren BHV1-Stämme Verwendung. Es handelt sich um 7 IBR-, 6 IPV-, 5 IBP- und 2 Abortstämme sowie um den australischen Enzephalitisstamm N 569. Sie sind nachstehend aufgeführt:

<u>Stamm</u>	<u>isoliert aus:</u>
1. Schönböken	Präputium
2. Spiel	Nase
3. Schleswig	Nase
4. Würzburg	Nase
5. Calw	Fetus
6. Ofterdingen	Nase (apathogen)
7. Freiburg	Vagina
8. Sontheim	Vagina
9. Jülich	Nase
10. EN 280	Präputium
11. Riems	Vagina
12. Wanderup	Präputium
13. Wien	Vagina
14. Rom	Nase
15. Ghent	Vagina
16. Wabu I	Präputium
17. Wabu II	Präputium
18. LA	Nase
19. Californien	Fetus
20. Australien	Vagina
21. N 569	Gehirn

3.1.2.3. Gewebekulturpassagen des BHV1-Stammes BFA 4

Zu Untersuchungen über Veränderungen am Genom eines BHV1-Stammes nach 1000 Gewebekulturpassagen wurden verschiedene Passagen des BHV1-Stammes BFA 4 verwendet.

BHV1-Stamm BFA 4 Gewebekulturpassagen: 7, 250, 350, 450, 600, 1000.

3.1.2.4. Virusisolate aus Tupferproben von BFA-Rindern

Zu Untersuchungen über Veränderung am Genom zweier BHV1-Stämme nach Tierpassagen wurden eigene, infizierte Rinder immunsupprimiert. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Infektion seronegativ.

Im einzelnen:

Die Rinder 710, 712, 720, 721 und 723 wurden mit dem BHV1-Stamm Würzburg infiziert, die Rinder 730 und 737 mit dem BHV1-Stamm EN 280.

3.1.3. Zellen, Medien und Kulturbedingungen

Für die Viruszucht sowie für Virusdifferenzierungen und Serumneutralisationstests wurden Kälbernieren-, Kälberhoden- und Kälberlungenzellkulturen verwendet.

Für die Virusanzüchtung zur DNA-Extraktion benutzte man Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) -Zellen.

Als Zellkulturmedium diente Minimal Essential Medium (MEM -HEPES Medium) mit 10%igem Kälberserumzusatz als Wachstumsmedium und mit 3%igem Kälberserumzusatz als Erhaltungsmedium.

Zellkulturmedium

MEM	14 mM HEPES
	9,6 g/l MEM
	26 mM Natriumhydrogen- karbonat
	200 I.E./ml Penicillin
	0,15 mg/ml Streptomycin

Die Zellen wurden in einem CO₂-Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert.

3.1.4. Lösungen und Puffer

Zell- und Viruszucht

Trypsinlösung

136,0 mM Natriumchlorid
2,6 mM Kaliumchlorid
8,0 mM Natriumhydrogen-
phosphat
1,5 mM Kaliumhydrogen-
phosphat
3,3 mM EDTA
0,125 % Trypsin
16,0 mg/ml Phenolrot

PBS (Phosphatgepufferte,
isotonische Salzlösung)
pH 7,4

0,7 mM Kalziumchlorid
2,7 mM Kaliumchlorid
1,5 mM Kaliumhydrogen-
phosphat
0,5 mM Magnesiumchlorid
140 mM Natriumchlorid
6,5 mM Natriumhydrogen-
phosphat

Virusreinigung

TEN (Tris, EDTA, Natriumchlorid)
pH 8,6

1 mM EDTA
140 mM Natriumchlorid
10 mM Tris

DNA-Extraktion

Lysepuffer mit RNase

10 mM Tris
1 mM EDTA
2 % Sarcosyl
200 µg/ml RNase

Tris-EDTA-Puffer

20 mM Tris
1 mM EDTA

DNA-Restriktion

TA (Tris-Azetat):
allgemeiner Enzympuffer
10x konzentriert
pH 7,9

330 mM Tris
660 mM Kaliumazetat
100 mM Magnesiumazetat
1 mg/ml BSA
5 mM DTT

DNA-Agarosegelelektrophorese

TA (Tris-Azetat)-Laufpuffer:
(50x konzentriert)

2,00 M Tris pH 7,8
0,25 M Natriumazetat
0,05 M EDTA

DNA-Probenpuffer:

40 % Sucrose
0,05 % Bromphenolblau
0.1 % SDS
1 mM EDTA

Southern-Transfer und Hybridisierung

SSC (20x konzentriert):	3,0 M Natriumchlorid 0,3 M Natriumzitat
Denhardttsche Lösung:	1 % BSA 1 % Polyvinylpyrrolidon 1 % Ficcoll in 6x SSC
DNA-Preaneal-Lösung:	5x Denhardttsche Lösung 5x SSC 100 µg/ml Hefe-RNA
Hybridisierungslösung:	5x SSC 1x Denhardttsche Lösung 100 µg/ml Hefe-RNA 0,1 % SDS 20 mM Natriumphosphat radioaktiv markierte Probe
Waschlösungen:	2x (1x, 0,1x) SSC

3.1.5. Chemikalien

<u>Name</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Agarose	Sigma
Äthanol	Merck
Bromphenolblau	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva
Kalziumchlorid	Merck
Chloroform	Seromed
Dithiotreitol (DTT)	Böhringer
EDTA	Serva
Ethidiumbromid	Serva
Ficoll	Pharmacia
HEPES (N-2-Hydroxyäthylpiper- azin-2-äthansulfonsäure)	Serva
Kalilauge	Merck
Kaliumazetat	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Magnesiumazetat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Kaliumchlorid	Merck
MEM (Minimal Essential Medium)	Seromed
Natriumazetat	Merck
Natriumzitat	Serva
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogenkarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumphosphat	Merck
Phenol	BRL
Polyvinylpyrrolidon	Serva
Saccharose	Merck
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva
Sephadex G-50	Pharmacia
Sucrose	Merck
Tris	Boehringer

3.1.6. Weitere Materialien

Medikamente

Voren-Lösung

Boehringer, Ingelheim

Radioaktive Substanzen

Alpha- ^{32}P -dCTP

Amersham Buchler

Nukleinsäuren

Hefe-RNA

Serva

1 kbp-ladder

BRL

Die Gensonde pEO wurde freundlicherweise von Dr.G. Keil, BFA Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Enzyme

Klenow-Polymerase

Boehringer, Mannheim

Restriktionsendonukleasen

Boehringer, Mannheim

RNAse

Sigma

Proteinase K

Boehringer, Mannheim

Antibiotika

Penicillin

Grünenthal

Streptomycin

Serva

Seren

Kälberserum

BFA Tübingen

Immunserum 35

BFA Tübingen

Nullserum 35

BFA Tübingen

Kits

Multiprime System

Amersham

3.1.7. Die Gensonde pEO

Die Gensonde pEO wurde an der BFA Tübingen in der Arbeitsgruppe von Dr. Günter Keil hergestellt.

Sie besitzt eine Länge von etwa 2,2 Kilobasenpaaren (kbp) und stammt aus dem Hind III L-Fragment des BHV1-Genoms. Dieser Genabschnitt war gewählt worden, da er für das Glykoprotein (gp) 76, eine der hauptimmunogenen Komponenten von BHV1, kodiert (Abb.1).

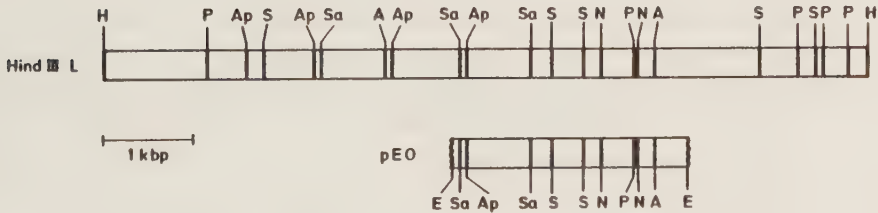


Abb.1: Hind III L-Fragment des BHV1-Genoms und Gensonde pEO mit Spaltstellen

3.2. Methoden

3.2.1. Zellzucht

Kälbernieren-, Kälberhoden- und Kälberlungen- sowie MDBK-Zellkulturen wurden in Rouxflaschen bei 37°C angezüchtet. Als Wachstumsmedium diente MEM-HEPES-Medium mit 10 % Kälberserumzusatz. Zur Vermehrung der Zellen wurde der dichte Zellrasen mit 5 ml pro Flasche Trypsinlösung 10 min bei 37°C inkubiert; danach lösten sich die Zellen ab. Sie konnten nun auf Röhrchen, Plastikflaschen oder Mikrotiterplatten gebracht oder weiter vermehrt werden.

3.2.2. Virusanzüchtung

Zur Herstellung eines Viruspools wurden Kälbernieren-, Kälberhoden-, oder Kälberlungenzellkulturen in Plastikfläschchen (25 cm²) angelegt.

Das Kulturmedium wurde abgegossen, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Viruszellkulturüberstand 30 min bei 37°C inkubiert, um die Adsorption des Virus an die Zelle zu ermöglichen. Danach wurden 10 ml MEM-HEPES-Medium mit 3 % Kälberserumzusatz pro Flasche als Erhaltungsmedium zugegeben. Die Virusernte erfolgte nach vollständigem Auftreten des zytopathischen Effekts (ZPE) nach ca. 48 Std. Nach Zentrifugation (2200 g/15 min) wurden die Chargen portioniert und bei -70°C gelagert.

3.2.3. Immunsuppression

Die Immunsuppression erfolgte mit Voren (Dexamethason-21-isonicotinat). Es wurden 25 mg/50 kg Körpergewicht dreimal im Abstand von jeweils 4 Tagen intramuskulär verabreicht.

3.2.4. Tupferentnahme und Tupferaufarbeitung

Die Tupfer wurden an der Besamungsstation am 8., 10. und 13. Tag nach der ersten Injektion des Immunsuppressivums entnommen und sofort nach Tübingen verschickt, bei den eigenen Versuchen vom 1. Tag nach der ersten Injektion an bis zum Ende der Virusausscheidung.

Zur Entnahme von Nasen-, Vaginal- und Präputialtupfern wurden sterile Klemmen und Gazestreifen verwendet, die in abgewogenen Spitzröhrchen gelagert waren, so daß nach der Tupferentnahme das Differenzgewicht als Grundlage für die weitere Verdünnung herangezogen werden konnte. Mit einem antibiotikahaltigem Medium (MEM-HEPES mit 1000 I.E. Penicillin und 750 I.E. Streptomycin/ml) wurde nun das Tupfermaterial auf 1:10 verdünnt und 30 min bei 4°C geschüttelt.

Der Gazestreifen wurde anschließend mittels einer sterilen Pinzette ausgewrungen und die erhaltene Mediummenge 10 min bei 2200 g zentrifugiert, um Schleim und Schleimhautpartikel abzutrennen.

Nun konnte der Überstand weiterverdünnt und auf Röhrchenzellkulturen gebracht werden. Bei der 1:10 Verdünnung war aufgrund der Toxizität des Tupfermaterials ein Mediumwechsel (MEM-HEPES-Medium mit 3 % Kälberserumzusatz) nach 30 min angezeigt.

Die Bebrütung erfolgte stationär in Brutschränken bei 37°C.

Die endgültige Ablesung über die Feststellung des ZPES erfolgte nach einer Woche. Für die Berechnung der Titer wurde nach Kärber (27) verfahren.

3.2.5. Serumneutralisationstest

Beim Serumneutralisationstest werden virusneutralisierende Antikörper im Serum nachgewiesen. Hierzu wird das zu untersuchende Serum zusammen mit einer Virussuspension inkubiert. Sind Virus und Antikörper homolog, so kommt es zu einer Neutralisation des Virus. Anschließend wird das Virus-Antikörper-Gemisch auf eine für das Virus empfängliche

Zellkultur gebracht und diese auf das Auftreten eines virus-spezifischen ZPE untersucht.

Durch Verdünnung des zu untersuchenden Serums läßt sich auch eine Aussage über den Antikörpertiter treffen (11,33).

Der Test wurde mit Gewebekulturröhrchen durchgeführt.

Dazu wurde zunächst eine Virussuspension des BHV1-Stammes BFA 4 mit $10 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$ hergestellt.

Das zu untersuchende Serum wurde in den eigenen Versuchen in Viererstufen mit MEM-HEPES-Medium (mit 3 % Kälberserum-zusatz) verdünnt und folgende Verdünnungen verwendet: unverdünntes Serum, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024 und 1:4096.

Die Serumproben der Besamungsbullen waren nur qualitativ, unverdünnt untersucht worden.

Jeweils 2,5 ml der Virussuspension wurden nun mit 2,5 ml Serumsuspension versetzt, vermischt und 90 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 4 Gewebekulturröhrchen pro Verdünnungsstufe mit je 1 ml Serum-Virusgemisch beschickt und das Ergebnis nach einer Woche durch Beurteilung des ZPE abgelesen. Die Berechnung erfolgte ebenfalls nach Kärber (27).

In jedem Test liefen eine Kontrolltitration des verwendeten Testvirus, eine negative, unbeimpfte Zellkontrolle und eine positive, nur mit Virussuspension versetzte Kontrolle mit.

3.2.6. Virusidentifizierung mittels Hyperimmunserum

Gewebekulturüberstand infizierter Kälbernierenzellen wurde in Zehnerschritten titriert und aus jeder Verdünnungsstufe je 2,5 ml in zwei neue Röhrchen verbracht. Die eine Reihe wurde nun mit 2,5 ml Nullserum die andere mit 2,5 ml BHV1-Immunserum versetzt und 90 min bei 37°C inkubiert.

Danach wurden diese Verdünnungsreihen auf Zellkulturen gebracht und nach einer Woche der Virustiter durch Begutachtung des ZPE bestimmt. Dazu wurde wieder nach Kärber (27) verfahren.

War die Titerdifferenz (in log 10) zwischen Virussuspen-

sion und Nullserum auf der einen Seite, und Virussuspension und Immuns serum auf der anderen Seite (Neutralisationsindex) größer oder gleich 3, so galt das isolierte Virus als BHV1.

3.2.7. Virusreinigung

100 ml Virussuspension wurden 30 min bei 2200 g zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer abzutrennen, der Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und mit 2 ml 20%iger Saccharose pro Röhrchen unterschichtet. Durch 90 min Zentrifugation mit 23000 UpM bei 4°C im SW 27 Rotor (Beckmann) wurde das Virus sedimentiert.

Die Sedimente wurden in TEN-Puffer resuspendiert, das Homogenat auf einen 10 - 60%igen Saccharosegradienten geschichtet und über Nacht bei 35000 UpM und 4°C im SW 41 Rotor zentrifugiert.

Die im Steulicht sichtbaren opaleszierenden Virusbanden konnten nun seitlich mit einer Spritze abgezogen werden. Die erhaltene Menge wurde in 1 ml TEN-Puffer resuspendiert und im Elektronenmikroskop beurteilt oder bei -70°C gelagert.

3.2.8. Agarose Gelelektrophorese und Southern-blot -Hybridisierung

3.2.8.1. Allgemeines

Die molekulare Hybridisierung beruht darauf, daß die zu untersuchende DNA denaturiert, d.h. in ihre Einzelstränge zerlegt wird, dann markierte, komplementäre Einzelstrang-DNA, eine sogenannte Gensonde, zugegeben wird, welche sich bei Abkühlung an den gesuchten Einzelstrang heftet und mit ihm ein Hybrid bildet. Durch die Markierung kann dieses Hybrid dann nachgewiesen werden.

Bei der Southern-blot-Hybridisierung wird die zu untersuchende DNA nach Extraktion und Spaltung mit Restriktionsenzymen zuerst in einem Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt, und die Fragmente werden auf eine Nitrozellulose transferiert, wo dann die Hybridisierung erfolgt (20,26).

3.2.8.2. DNA-Extraktion

24-Kavitäten-Platten mit Madin-Darby-Bovine-Kidney-(MDBK)-Zellen wurden pro Kavität mit einer m.o.i. > 10 BHV1-Zellkulturüberstand infiziert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dem Auftreten des ZPE wurde der Überstand verworfen, jeder Kavität 0,3 ml Lysepuffer mit RNase (200 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt und 1 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 6 μl Proteinase K (10 mg/ml) pro Kavität zugegeben, die Mischung 1 Std. bei 56°C gehalten und die lysierten Zellen in Eppendorfreaktionsgefäße überführt.

In jedes Eppendorfreaktionsgefäß wurde nun 0,3 ml Phenol zugegeben, der Inhalt 15 min durchmischt, 3 min zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß verbracht. In der gleichen Weise erfolgten die nächsten beiden Extraktionsschritte mit je 0,3 ml Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform. Zu dem nun erhaltenen Überstand wurden 35 μl Natriumazetat (3M) und 1 ml 100%iges Äthanol zugegeben, das Ganze gut durchmischt und 15 min bei -70°C inkubiert.

Anschließend wurden die Proben 15 min zentrifugiert, so daß die DNA als bräunlicher Schleier am Grund des Reaktionsgefäßes sichtbar wurde. Der Überstand wurde nun vorsichtig abgekippt und die pelletierte DNA noch zweimal mit 70%igem Äthanol gewaschen.

Nach einer Trocknung von ca. 10 min in der Speedvac löste man die DNA in 0,1 ml 20 mM Tris / 1 mM EDTA (pH 7,5) und lagerte sie bei $+4^{\circ}\text{C}$.

3.2.8.3. DNA-Restriktion

Für die DNA Spaltung wurden die Restriktionsendonukleasen Sal I, Xho I und Pst I verwendet. Die Spaltung erfolgte in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer, die Inkubationszeit betrug 3-4 Stunden bei 37°C .

3.2.8.4. Agarose Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese zur Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte mit 0,6%iger Agarose. Dabei wurden 1,8 g Agarose in 294 ml Aqua dest. gelöst und mit 6 ml 50x Tris-Azetat (TA) und 9 μ l Ethidiumbromid versetzt. Der Laufpuffer bestand aus 40 ml 50x TA und 60 μ l Ethidiumbromid auf 2 l Aqua dest. Die Laufzeit betrug 8 Std., die Stromstärke 60 mA.

Anschließend wurde das Gel auf einem UV (254 nm) -Transilluminator durch einen Rotlichtfilter fotografiert.

3.2.8.5. DNA-Transfer auf Nitrozellulosefilter

Der Transfer der DNA-Fragmente auf Nitrozellulosefilter erfolgte ebenso wie die späteren Hybridisierungsschritte in enger Anlehnung an die von Southern 1975 beschriebene Methode (73).

Das Gel wurde für 1 Std. in 1 M KOH gelegt, danach mit Aqua dest. abgespült, dreimal für 20 min in 1M Tris (pH 7,5) und einmal für 30 min in 6x SSC geschwenkt. Danach legte man das Gel auf die Durchsaugereinrichtung (Abb.2) und beließ es über Nacht unter Verwendung von 20x SSC als Transferpuffer.

Der Nitrozellulosefilter wurde anschließend in 6x SSC gewaschen und 4 Std. im Vakuumofen bei 80°C gebacken.

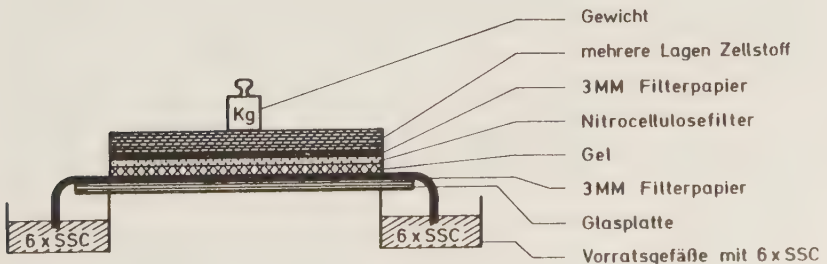


Abb.2: Durchsaugereinrichtung für den DNA-Transfer auf Nitrozellulosefilter

3.2.8.6. Radioaktive Markierung der Gensonde mittels Multipriming

Bei dieser Methode wird zunächst die doppelsträngige DNA denaturiert. An diese beiden Einzelstränge werden dann zuerst Oligonukleotide (meist Hexanukleotide) als Starter, und schließlich Einzelnukleotide, von denen eines radioaktiv markiert ist, anhybridisiert.

Gegenüber der Nicktranslation hat das Multipriming den Vorteil der höheren Effektivität im Einbau.

13 μ l (ca. 150 ng DNA) der Gensonde pEO wurden mit 12 μ l Aqua dest. verdünnt und 5 min bei 100°C aufgeköcht. Dann wurden die Oligonukleotide, die Nukleotide dATP, dTTP, dGTP und das radioaktiv markierte dCTP* sowie das Klenow-Fragment der E.-coli-Polymerase I zugegeben und 3 Std bei 22°C inkubiert.

Durch eine Sephadexsäule wurden anschließend nicht eingebaute Nukleotide abgetrennt und unter ständiger Messung der Radioaktivität die radioaktiv markierte DNA gesammelt. Im β -Counter wurden die Fraktionen erneut auf ihre Radioaktivität untersucht und die geeigneten Portionen vereinigt.

3.2.8.7. Hybridisierung und Autoradiographie

Nach Einschweißen in eine stabile Plastikfolie wurde die Membran mit den auf sie transferierten DNA-Banden 2-4 Std. bei 68°C mit Preanneallösung vorinkubiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte dann über Nacht ebenfalls bei 68°C im Wasserbad.

Der Nitrozellulosefilter wurde anschließend je dreimal in 2x, 1x und 0,1x SSC gewaschen, getrocknet und die markierten Banden durch Autoradiographie (2 Tage bei -70°C) sichtbar gemacht.

4. Ergebnisse

4.1. Virusidentifizierung

4.1.1. Auswertung der Vorversuche

In der Zeit vom Februar 1984 bis zum Mai 1986 waren insgesamt 845 Bullen (570 Jungbullen und 275 Altbullen) auf BHV1-Antikörper und BHV1-Ausscheidung sowie auf Virusausscheidung allgemein untersucht und die Virus-positiven Tupfer bis zur weiteren Klassifizierung bei -70°C gelagert worden.

Die Untersuchungen hatten nur qualitativen Charakter; Antikörper- und Virustiter waren nicht bestimmt worden.

Von 275 Altbullen waren 180 (65,45 %) seropositiv, 95 (34,55 %) seronegativ. Von 570 Jungbullen konnten bei 450 (78,95 %) keine Antikörper nachgewiesen werden, 120 (21,05 %) waren seropositiv.

Von den 875 Bullen hatten 14 Bullen (1,6 %) spontan (ohne medikamentelle Immunsuppression) Virus ausgeschieden. Es handelte sich hierbei um 3 seropositive, mit attenuiertem Virus geimpfte Altbullen und 11 seronegative, ungeimpfte Jungbullen. Bei diesen Untersuchungen waren - bis auf zwei Ausnahmen - nur Präputialtupfer entnommen worden (Tab.1).

81 seropositive Bullen (54 Altbullen und 27 Jungbullen) waren einer medikamentellen Immunsuppression mit Dexamethason (Voren) unterzogen worden, da sie als ungeimpft galten. Dadurch wurde bei 26 Tieren Virus nachgewiesen. Es handelte sich um 22 Altbullen (40,7 % der immunsupprimierten Altbullen) und 4 Jungbullen (14,8 % der immunsupprimierten Jungbullen).

Zehn Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung ungeimpft, 15 Tiere jedoch früher mit attenuiertem Virus vakziniert worden. Der Impfstatus des Bullen Pi. konnte nicht in Erfahrung gebracht werden (Tab.2).

Tab.1: Spontane Virusausscheider

<u>Bulle</u>	<u>AB/JB</u>	<u>Datum</u>	<u>pos. Tupfer</u>
Pr.	AB	28.02.84	PT
Ek.	JB	5.03.84	PT
Le.	AB	29.05.84	PT
Gr.	JB	4.12.84	PT
To.	JB	28.12.84	PT
Ba.	JB	18.02.85	PT
Di.	JB	18.02.85	PT
Sa.	JB	26.02.86	PT
Sz.	AB	3.03.86	PT
Pa.	JB	18.03.86	PT/NT
La.	JB	18.03.86	PT
Ul.	JB	18.03.86	PT/NT
Uv.	JB	10.03.86	NT
Si.	JB	24.03.86	NT

AB: Altbulle

JB: Jungbulle

PT: Präputialtupfer

NT: Nasentupfer

Die Namen der Bullen sollten nicht genannt werden
und wurden deshalb verschlüsselt.

Tab.2: Virusausscheider nach medikamenteller
Immunsuppression

<u>Bulle</u>	<u>AB/JB</u>	<u>Datum</u>	<u>pos. Tupfer</u>	<u>geimpft</u>
Ps.	AB	29.02.84	NT 8/10	-
Ls.	JB	25.07.84	NT 8/10/13 PT 13	-
In.	JB	25.07.84	NT 8/10/13	-
Le.	AB	10.10.84	NT 8/10	+
Hu.	AB	23.01.85	NT 8/10	+
Ze.	AB	13.02.85	NT 8/10/13	+
Lu.	JB	13.02.85	NT 8/10/13	-
Da.	AB	20.03.85	NT 8	+
Bu.	AB	25.03.85	NT 13	+
Po.	AB	22.05.85	NT 8/10	+
Su.	AB	22.05.85	NT 8/10/13	+
Ss.	JB	15.07.85	PT 13	+
Me.	AB	16.07.85	NT 8/10	-
Sl.	AB	16.07.85	NT 10	-
Be.	AB	16.07.85	NT 10	-
Li.	AB	16.10.85	NT 8/10/13	+
Se.	AB	16.10.85	NT 8/10/13	+
Sd.	AB	16.10.85	PT 8/13	+
Pu.	AB	16.10.85	NT 8/10/13 PT 13	+
Pl.	AB	14.01.86	NT 8/10/13	+
St.	AB	14.01.86	NT 8/10/13	+
De.	AB	14.01.86	NT 10/13	-
Lr.	AB	14.01.86	NT 10/13	+
Pp.	AB	14.01.86	NT 13	-
Pi.	AB	1.04.86	NT 8 PT 8	?
Tr.	AB	7.04.86	NT 13	-

AB: Altbulle

JB: Jungbulle

PT: Präputialtupfer

NT: Nasentupfer

Bei 21 von den 26 Ausscheidern konnte Virus nur aus den Nasentupfern isoliert werden, bei 2 Tieren nur aus den Präputialtupfern und bei weiteren 3 Tieren sowohl aus den Nasen-, als auch aus den Präputialtupfern.

Die Tupferproben waren am 8., 10. und 13. Tag nach der ersten Injektion des Immunsuppressivums entnommen worden. Bei 10 Bullen wurde Virus an allen 3 Tagen im Nasentupfer gefunden, bei 5 Bullen nur am 8. und 10. Tag, bei 2 Bullen am 10. und 13. Tag, bei 3 Bullen nur am 13. und bei jeweils 2 Tieren am 8. bzw. 10. Tag.

Wegen der geringen Anzahl von Präputialtupfern wurde ihrer Verteilung auf die unterschiedlichen Tage keine Bedeutung zugemessen.

4.1.2. Ergebnisse der Virusidentifizierungen

Bei den weiteren Untersuchungen mußte auf passagiertes Virus zurückgegriffen werden, da aus den Originalproben kein infektiöses Agens mehr zu isolieren war.

Aus jeder der insgesamt 57 Tupferproben der 26 immunsupprimierten Tiere konnte Virus gewonnen werden. Von den 16 Tupfern der 14 nicht provozierten Bullen konnte nur aus 11 Tupfern von 11 Tieren Virus isoliert werden. In den Proben der Bullen Pa., Ul. und Uv konnte kein Virus mehr nachgewiesen werden.

Es standen also für die Viruscharakterisierung 68 Virusisolate von 36 Bullen (der Bulle Le. war immunsupprimiert worden, obwohl er bereits unter natürlichen Umständen Virus ausgeschieden hatte) zur Verfügung.

Durch die Identifizierung mit Immunserum 35 sowie durch elektronenmikroskopische Untersuchung konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei allen 68 Virusisolaten um BHV1 handelte. Andere Erreger wurden nicht gefunden. Die Ergebnisse früherer Untersuchungen, nach denen 5 ZPE-positive Proben als nicht BHV1 klassifiziert worden waren, konnten in den eigenen Versuchen nicht bestätigt werden.

4.2. BHV1-Ausscheidung von BFA-Rindern nach Immunsuppression

Die BFA-Rinder 710, 712, 720, 721 und 723 waren infiziert mit dem Stamm BHV1-Würzburg und die Rinder 730 und 737 mit dem Stamm BHV1-EN 280.

Nach Immunsuppression mit Voren (25 mg/ 50 kg KGW) wurden täglich Nasentupfer entnommen und aufgearbeitet.

Alle Tiere schieden Virus aus (Tab.4).

Die Virusausscheidung begann zwischen dem 5. und 10. Tag nach Immunsuppression und endete zwischen dem 16. und 19. Tag. Eine Ausnahme bildete das Rind 720, bei dem die Virusausscheidung erst am 18. Tag begann.

Die maximalen Titer lagen zwischen $10^{5.5}$ und $10^{6.5}$ KID₅₀/g Schleim.

Der Versuch wurde am 22. Tag abgebrochen, obwohl das Rind 720 noch Virus ausschied, da als sicher anzunehmen war, daß es sich vom nebenstehenden Rind 737 angesteckt hatte.

Die Antikörpertiter wurden 4 Wochen nach Immunsuppression mittels Serumneutralisationstest bestimmt (Tab.3).

Tab.3: Antikörpertiter der BFA-Rinder 4 Wochen nach
Immunsuppression

Tier Nr.	AK-Titer
710	2.408
712	2.408
720	2.559
721	2.408
723	2.105
730	2.257
737	1.505

(Titer in -log 10)

Tab.4: BHV1-Titer der immunsupprimierten BFA-Rinder

Tage nach

1. Kortikosteroid-
injektion

Tiere Nr.

	710	712	720	721	723	730	737
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	1.75
6	0	0	0	0	0	0	3.50
7	1.00	0	0	0	0	3.75	4.00
8	2.50	0	0	2.50	0	3.50	5.50
9	2.50	3.50	0	2.50	0	5.50	7.50
10	3.00	3.75	0	3.75	1.00	5.25	7.50
11	4.50	5.75	0	5.25	2.75	6.00	8.50
12	4.50	5.25	0	5.75	4.75	7.00	6.50
13	4.50	5.75	0	5.50	4.00	7.75	5.75
14	5.50	5.50	0	6.25	6.50	5.25	2.50
15	4.75	5.50	0	6.50	5.00	5.50	5.00
16	5.00	0	0	5.50	2.50	4.00	0
17	1.50	0	0	1.50	1.00	3.25	0
18	2.00	0	4.00	1.00	0	3.50	0
19	0	0	3.50	0	0	0	0
20	0	0	4.75	0	0	0	0
21	0	0	5.75	0	0	0	0
22	0	0	6.50	0	0	0	0

(Titer in $-\log 10$)

4.3. Restriktionsmuster nach Southern-blot-Hybridisierung

4.3.1. Restriktionsmuster der BHV1-Isolate aus Tupferproben der Besamungsbullen

Extrahierte BHV1-DNA aus den klassifizierten Virusproben wurde nach Spaltung und Auftrennung durch Agarose Gelelektrophorese einer Southern-blot-Hybridisierung mit der Gensonde pEO unterzogen.

In der Restriktionsenzymanalyse (Endonuklease Fingerprinting) mit den Endonukleasen Xho, Sal I und Pst I konnten keine Unterschiede in den Banden zwischen den einzelnen BHV1-Isolaten festgestellt werden.

Bei Verwendung der Restriktionsendonukleasen Xho und Sal I zeigten sich auch nach Southern-blot-Hybridisierung keine Unterschiede in den Restriktionsmustern.

Bei Verwendung der Restriktionsendonuklease Pst I jedoch, ließen sich nach der Hybridisierung zwei deutlich unterscheidbare Restriktionsmuster erkennen (Abb.3,4,5).

Von den 45 getesteten BHV1-Isolaten aller 36 Bullen hybridisierten bei 35 Isolaten von 28 Bullen ein 1,8 kbp und ein 4,0 kbp großes Restriktionsfragment, während bei 10 Isolaten von 8 Tieren statt dem 4,0 kbp Abschnitt ein 5,7 kbp großes Stück hybridisierte. Bei den Letztgenannten handelte es sich um die Bullen Ps., In., Lu., Me., Be., De., Tr. und Sl. Alle diese Tiere waren zum Zeitpunkt der Tupferentnahme nicht geimpft.

BHV1-Isolate vom gleichen Tier, aber aus Tupfern an verschiedenen Tagen nach Immunsuppression gewonnen, verhielten sich gleich. In den Proben wurde immer nur das gleiche Muster gefunden.

4.3.2. Restriktionsmuster verschiedener BHV1-Stämme

21 BHV1-Stämme wurden nach Pst I-Spaltung und Auftrennung mittels Gelelektrophorese durch Southern-blot-Hybridisierung analog den BHV1-Isolaten untersucht.

Bei 12 Stämmen hybridisierten ein 1,8 kbp und ein 4,0 kbp großer Genabschnitt, bei 5 Stämmen ein 1,8 und ein 5,7 kbp großer Abschnitt und bei 4 Stämmen nur ein 7,5 kbp großer Abschnitt (Abb.6).

Zwischen Restriktionsmuster und Ursprungsorgan ließ sich kein Zusammenhang herstellen.

Muster 1 (1,8 und 4,0 kbp-Fragment):

BHV1-Stämme Schönböken (BFA 4), Ofterdingen, Freiburg, Sontheim, Jülich, EN 280, Riems, Wanderup, Wien, Rom, Ghent und Wabu II.

Muster 2 (1,8 und 5,7 kbp-Fragment):

BHV1-Stämme Schleswig, Würzburg, Calw, LA und Californien.

Muster 3 (7,5 kbp-Fragment)

BHV1-Stämme Spiel, Wabu I, Australien und N569.

4.3.3. Restriktionsmuster verschiedener Gewebekulturpassagen des BHV1-Stammes BFA 4

Die sechs verschiedenen Gewebekulturpassagen des BHV1-Stammes BFA 4 (7., 250., 350., 450., 600. und 1000. Passage) ließen nach Pst I-Spaltung und Hybridisierung das gleiche Restriktionsmuster erkennen (Abb.7).

Es hybridisierte ein 1,8 kbp und ein 4.0 kbp großes Restriktionsfragment (Muster 1).

4.3.4. Restriktionsmuster zweier BHV1-Stämme nach Tierpassagen

Fünf Rinder waren mit dem Stamm BHV1-Würzburg infiziert worden, 2 Rinder mit dem Stamm EN 280. Nach Immunsuppression wurden die erhaltenen Virusisolate mit Pst I gespalten, aufgetrennt und analog den anderen Proben mittels Southern-blot-Hybridisierung untersucht. BHV1-Isolate der mit EN 280 infizierten Rinder 730 und 737 zeigten die gleichen Restriktionsmuster wie der Stamm EN 280. Es hybridisierten ein 1,8 und ein 4,0 kbp großer Abschnitt (Muster 1).

Von den Isolaten der mit BHV1-Würzburg infizierten Tiere verhielten sich jene der Rinder 710, 712, 721 und 723 wie der Ursprungsstamm. Es hybridisierten jeweils ein 1,8 und ein 5,7 kbp großes Stück (Muster 1), während das Isolat aus dem Rind 720 das gleiche Muster zeigte wie die Rinder 730 und 737, bzw. der Stamm EN 280 (Abb.8).

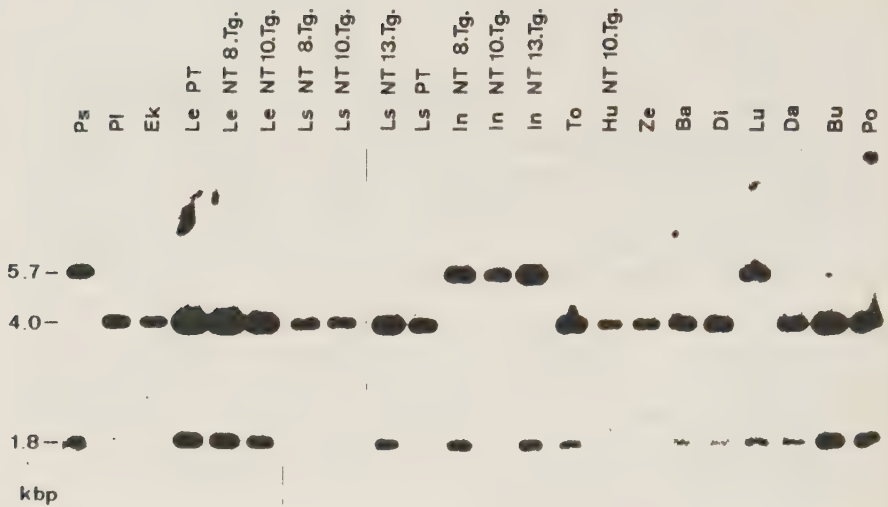


Abb. 3

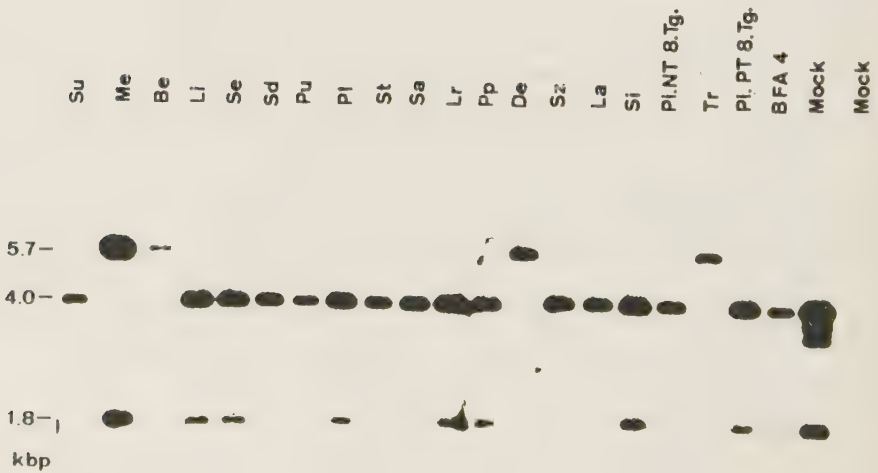


Abb. 4

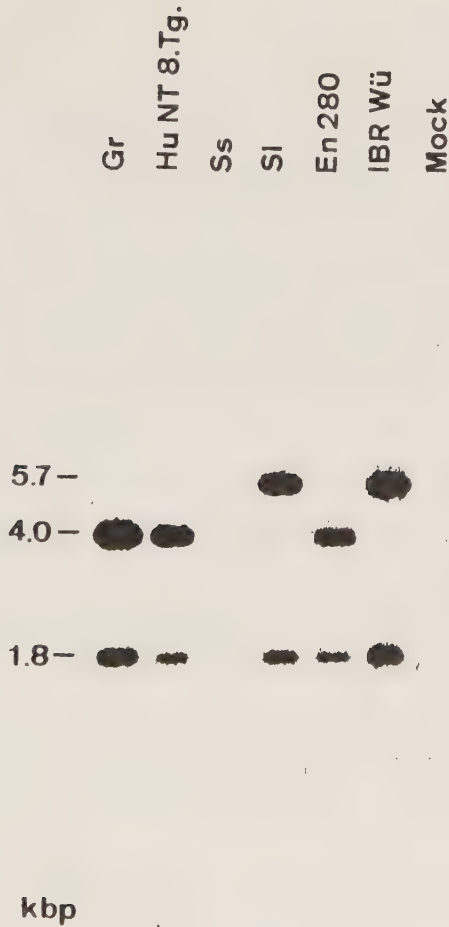


Abb.5

Abb.3, 4, 5: Restriktionsmuster der Virusisolate von Besamungsbullen nach Southern-blot-Hybridisierung. Als Kontrollen dienten die Stämme BFA 4, EN 280 und IBR-Würzburg, sowie unbeimpfte Zellen. Die Namen der Tiere wurden verschlüsselt.

Mock: Negative Kontrolle

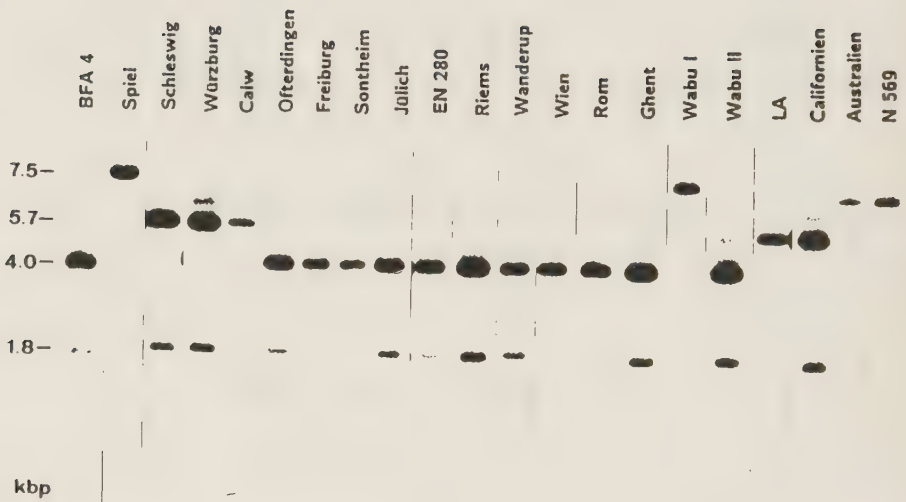


Abb.6: Restriktionsmuster von BHV1-Stämmen.
Kontrollen siehe Abb.4.

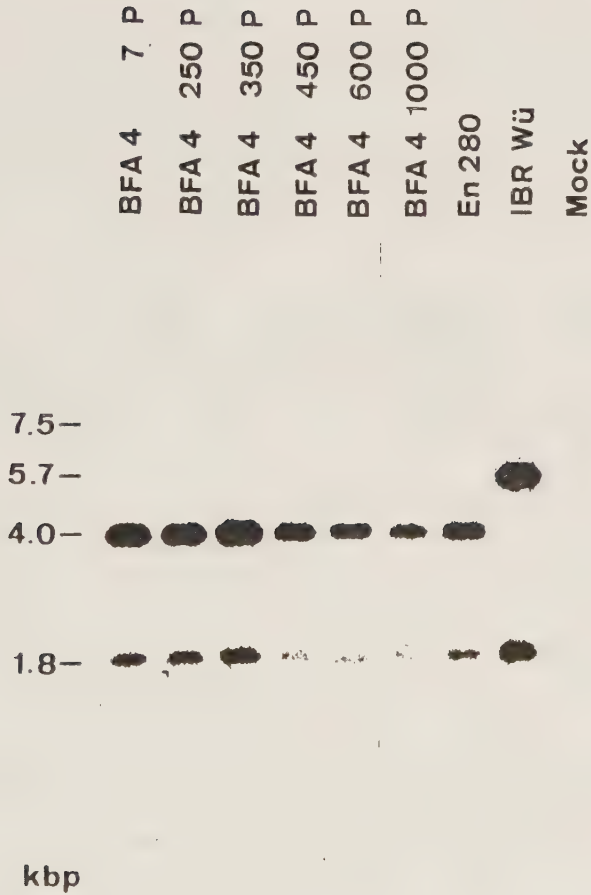


Abb.7: Restriktionsmuster verschiedener Gewebekulturpassagen des BHV1-Stammes BFA 4.

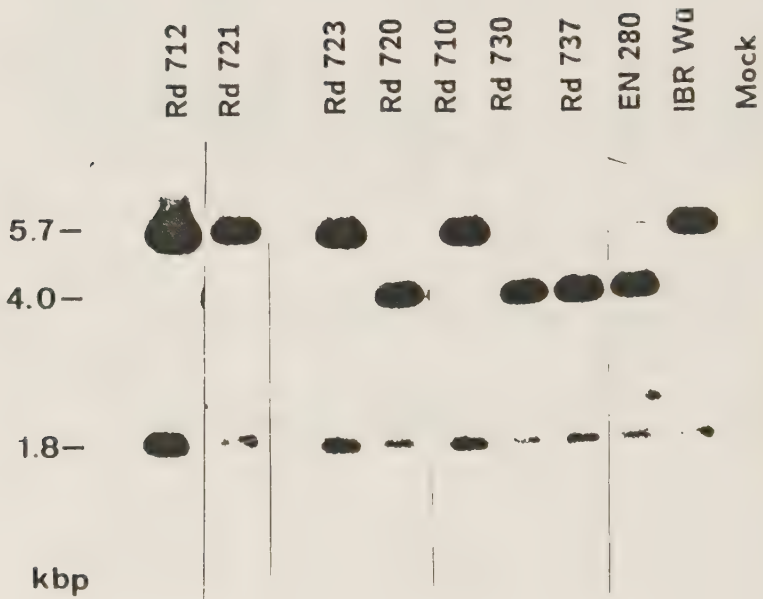


Abb.8: Restriktionsmuster der Virusisolate von immunsupprimierten BFA-Rindern. Als Kontrollen dienten BHV1-Stämme Würzburg und EN 280.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, bereits abgeschlossene Untersuchungen zu BHV1-Immunstatus und BHV1-Latenz von Besamungsbullen zusammen mit eigenen Versuchen auszuwerten und mittels einer Gensonde die Virusisolate näher zu charakterisieren. Ferner wurde die Tauglichkeit dieser Gensonde zur Unterscheidung verschiedener BHV1-Stämme untersucht.

5.1. BHV1-Immunstatus und BHV1-Latenz bei Besamungsbullen

In den Voruntersuchungen waren 875 Besamungsbullen (neu eingestellte Jungbullen und aus Wartebullenhaltungen an die Station zurückgekehrte Altbullen) auf BHV1-Antikörper und BHV1-Virusausscheidung untersucht worden.

Da an dieser Besamungsstation einmal jährlich mit BHV1-Lebendvakzine (eine 250. Passage des BHV1-Stammes BFA 4) geimpft wurde, verwundert die Zahl von über 65 % seropositiven Altbullen nicht. Die seronegativen Tiere waren wahrscheinlich bereits vor der jährlichen Impfung in ihre Wartebullenhaltungen abgegeben worden.

Der Prozentsatz der seropositiven Jungbullen - 21 % der untersuchten Tiere - verdient dagegen schon deshalb eine größere Beachtung, weil diese Bullen - zumindest an der Besamungsstation - vor der Untersuchung nicht geimpft worden waren. Man muß davon ausgehen, daß ein großer Teil dieser Tiere zum Zeitpunkt der Einstellung bereits latent mit Feldvirus infiziert war. Dieser Prozentsatz übertrifft die durchschnittliche Verseuchungsrate jener Gebiete, aus denen die Tiere stammen (11). Möglicherweise wurden einige Bullen auf dem Viehmarkt mit BHV1 infiziert, worauf auch die Tatsache hinweisen könnte, daß bei den Virusausscheidern (siehe unten) keine Antikörper nachzuweisen waren. Die Gefahr einer Ansteckung durch Streß bei großen Tieransammlungen ist oft beschrieben worden (34,35,42,59,85).

Neben dem Immunstatus waren die Bullen auch auf Virusaus-

scheidung untersucht worden.

In eigenen Versuchen wurde nachgewiesen, daß es sich bei allen Virusisolaten um BHV1 handelte.

Im Rahmen der Untersuchungen waren 16 Bullen als spontane Virusausscheider aufgefallen. Bei 13 dieser Tiere handelte es sich um seronegative, ungeimpfte Jungbullen, bei denen davon ausgegangen werden muß, daß sie sich gerade im Inkubationsstadium befanden und Feldvirus ausschieden. Die restlichen 3 Tiere waren geimpfte, seropositive Altbullen. Bei diesen könnte es sich bei dem isolierten Virus sowohl um Impf-, als auch um Feldvirus gehandelt haben.

Einundachtzig Bullen waren immunsupprimiert worden, da sie als nicht geimpft galten, aber Antikörper bei ihnen nachgewiesen worden waren. Die Überprüfung ergab jedoch, daß von den 26 Virusausscheidern nur 10 zum Zeitpunkt der Immunsuppression ungeimpft waren. Natürlich können mit attenuiertem Virus geimpfte, also latent infizierte Tiere Impfvirus ausscheiden, so daß sich eine Immunsuppression eigentlich erübrigt hätte. Es ergab sich jedoch so die Gelegenheit, Impf- und Feldvirusstämme im Rahmen der Möglichkeiten zu vergleichen.

Ungeklärt bleibt die Frage, warum von den 81 Tieren nur bei 26, also bei etwa 32 %, eine Reaktivierung möglich war. Pastoret (59) spricht von 60 % und in eigenen Untersuchungen unter den gleichen Bedingungen gelang es stets, bei mindestens 80 % latent infizierter Versuchstiere eine Virusausscheidung nachzuweisen. Mit der Tupferentnahme am 8., 10. und 13. Tag nach Immunsuppression hätte man eigentlich nach den Angaben in der Literatur (61,78) und eigenen Erfahrungen die Virusexkretion nachweisen können. Es ist allerdings denkbar, daß manche Proben durch den Transport geschädigt wurden, besonders wenn die ursprünglichen Virustiter schon niedrig waren, wie bei Reaktivierung von BHV1, insbesondere bei immunkompetenten Tieren beschrieben (61,79,80). Dafür sprächen auch die Tatsachen, daß aus allen, bei -70°C gelagerten Originalen kein infektiöses Virus mehr zu reisolieren war und deshalb für die weiteren Versuche auf passagiertes Virus zurückgegriffen werden mußte, und daß aus

Tupfern von 3 Bullen überhaupt kein Virus mehr nachzuweisen war.

Bei den Vorversuchen waren weder Virus- noch Antikörpertiter bestimmt worden.

Auffällig ist, daß bei 21 von 26 immunsupprimierten Bullen die Virusausscheidung nur aus dem Respirationstrakt nachzuweisen war, bei 3 Tieren aus Respirations- und Genitaltrakt und nur bei 2 Tieren ausschließlich aus dem Genitaltrakt. Das mag eine Bestätigung des "Trends" zur respiratorischen Form der BHV1-Infektionen sein, wie in den letzten Jahren häufig beschrieben (91).

Virusisolate aus 5 ZPE-positiven Tupfern waren zunächst als nicht-BHV1 befunden worden. In den eigenen Versuche gelang jedoch die Identifizierung als BHV1.

5.2. Immunsuppression der BFA-Rinder

Die Immunsuppression und der Nachweis der Virusreexkretion der BFA-Rinder gelang problemlos. Sowohl Ausscheidungsdauer, als auch Ausscheidungsmenge lagen im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Daten (61,77,80) und der eigenen Erfahrungen. Nur beim Rind 720 begann die Virusausscheidung erst am 18. Tag nach der ersten Vorengabe. Aufgrund der Tatsache jedoch, daß das Rind 720 während des gesamten Versuches neben dem Rind 737 stand und dieses wiederum 11 Tage lang große Mengen Virus ausschied sowie aufgrund der weiteren Untersuchungen mit den Virusisolaten (siehe unten), kann als sicher gelten, daß beim Rind 720 die Reaktivierung der latenten Infektion nicht gelang und es stattdessen vom Rind 737 angesteckt wurde.

Bemerkenswerterweise wurde bei dem Tier mit der höchsten Virusausscheidung (Rind 737) 4 Wochen nach Immunsuppression der niedrigste Antikörpertiter ermittelt. Den höchsten Antikörpertiter wies das neu infizierte Rind 720 auf.

5.3. Charakterisierung der BHV1-Isolate

Die weitere Charakterisierung der Virusisolate erfolgte mittels DNA-Restriktion und Southern-blot-Hybridisierung mit der Gensonde pEO.

Bei der Restriktionsenzymanalyse (Restriktion Endonuklease Fingerprinting) ließen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten feststellen. Ebenso scheiterte der Versuch nach DNA-Spaltung mit den Endonukleasen Xho I und Sal I und nachfolgender Hybridisierung. Bei Verwendung der Endonuklease Pst I jedoch fand man nach Hybridisierung mit der Gensonde pEO zwei unterschiedliche Restriktionsmuster.

Beim häufigerem Muster 1 (35 von 45 Proben) hybridisierte ein 1,8 und ein 4,0 kbp großes Fragment, beim selteneren Muster 2 (10 von 44 Proben) ein 1,8 und ein 5,7 kbp Fragment. Virusisolate des gleichen Tieres von unterschiedlichen Tagen nach Immunsuppression verhielten sich gleich, verschiedene Muster in einer Probe wurden nicht beobachtet.

Muster 2 wurde nur in Isolaten immunsupprimierter Tiere gefunden und zwar nur in Tupfern aus dem Respirationstrakt und ausschließlich bei ungeimpften Bullen. Virusisolate aus geimpften Tieren hingegen zeigten das gleiche Muster wie der Impfstamm BFA 4 (Muster 1), während von 10 ungeimpften Tieren 8 ein anderes Muster (Muster 2) aufwiesen.

Nach diesen Ergebnissen war denkbar, daß sich das BHV1-Genom unter Immunsuppression änderte, oder daß ein Unterschied zwischen respiratorischen und genitalen oder zwischen Impf- und Feldvirusstämmen gefunden war.

In weiteren Versuchen wurden deshalb verschiedene BHV1-Stämme sowie Virusisolate nach Zellkultur- und Tierpassagen auf das Vorkommen dieser unterschiedlichen Restriktionsmuster untersucht.

Dabei war dann aufgrund der gemachten Erfahrungen zur DNA-Restriktion nur noch die Endonuklease Pst I verwendet worden. Mit ihr gelang es, bei 21 BHV1-Stämmen durch Southern-blot-Hybridisierung 3 verschiedene Restriktionsmuster zu beobachten. Zwölf Stämme zeigten das Muster 1 und 5 Stämme das Muster 2, während bei 4 Stämmen nur ein 7,5 kbb

Fragment (Muster 3) zu erkennen war. Ein Zusammenhang zwischen Restriktionsmuster und Ursprungsorgan, Pathogenität oder geographischer Herkunft konnte nicht ermittelt werden, was nach früheren Berichten in der Literatur auch nicht zu erwarten gewesen war (43).

Diese Experimente zeigten die Stabilität der Muster. Der BHV1-Stamm BFA 4 behielt sein Restriktionsmuster (Muster 1) über 1000 Gewebekulturpassagen. Reisolat latent infizierter, immunsupprimierter Rinder wiesen die gleichen Restriktionsmuster auf wie die Originalstämme. Auch hier verhielten sich die Virusisolate aus den Proben der gleichen Tiere gewonnen an unterschiedlichen Tagen gleich.

Nach diesen Ergebnissen ist nicht anzunehmen, daß sich das BHV1-Genom unter Immunsuppression oder nach Tier- bzw. Gewebekulturpassagen ändert, wie bei anderen Virusarten nachgewiesen. Auch ergaben sich keinerlei Hinweise auf den Einfluß unterschiedlicher Restriktionsmuster auf Pathogenität und Organmanifestation.

Eine gewisse Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen zur Differenzierung von BHV1-Stämmen besteht bei den Experimenten von Metzler et al. (40), die mittels monoklonaler Antikörper ebenfalls 3 BHV1-Typen unterscheiden konnten. Mehrere BHV1-Stämme, die Metzler et al. untersuchten, standen auch für die eigenen Versuche zur Verfügung. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen reagierten die Stämme LA und Calw (BHV1.1 bei Metzler) anders als die Stämme Sontheim, Wien, Freiburg, Wabu und Spiel (BHV1.2 bei Metzler). Allerdings ist nicht bekannt, ob Wabu I oder Wabu II, die in den eigenen Untersuchungen unterschiedlich reagierten, getestet wurden. Keine Übereinstimmung besteht beim Stamm Spiel, der bei Metzler wie der Stamm Freiburg reagierte. Auch gelang es in den eigenen Untersuchungen nicht, zwischen den Stämmen Sontheim und Wien (BHV1.2a) auf der einen und Wabu II und Freiburg (BHV1.2b) auf der anderen Seite einen Unterschied zu finden.

Nach diesen Ergebnissen kann man folgern, daß von den insgesamt 36 immunsupprimierten Bullen 8 mit Sicherheit ein anderes als das Impfvirus ausgeschieden haben. Die Unterscheidung von Impf- und Feldvirus war bei den anderen 28

Tieren nicht möglich, es ist jedoch auffällig, daß keines der Isolate aus einem geimpften Tier ein anderes Restriktionsmuster als jenes des Impfstammes aufwies. Das läßt den Schluß zu, daß zumindest ein Großteil dieser Tiere aufgrund ihres guten Immunstatus durch die Impfung mit attenuierter Vakzine vor Feldvirusinfektionen weitgehend geschützt waren. Dafür spricht auch, daß in keiner einzigen Probe verschiedene Muster beobachtet werden konnten, obgleich sowohl Mischinfektionen mit mehreren BHV1-Stämmen, als auch Reexkretion von Impf- und Feldvirus nach Immunsuppression beschrieben wurden (51). Dieser Schutz ist allerdings mit der Gefahr der spontanen Ausscheidung von Impfvirus verbunden.

Keine große Bedeutung wird der Tatsache zugemessen, daß das Muster 2 nur aus Nasentupfern isoliert worden war, da der größte Teil der Virusisolate aus dem Respirationstrakt stammte.

Gleiches gilt für die Beobachtung, daß Muster 2 nur bei immunsupprimierten Tieren nachzuweisen war, da das gleiche Muster auch bei einigen BHV1-Stämmen auftrat und der größte Teil der untersuchten Isolate von immunsupprimierten Tieren stammte.

Die unterschiedlichen Restriktionsmuster erklären sich aus dem Verlust von Pst I-Spaltstellen. Frühere Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß es sich hierbei um Punktmutationen handelt, die auf die Genexpression keinen Einfluß haben (66). Beim Muster 1 sind beide relevanten Pst I-Spaltstellen noch vorhanden. Beim Muster 2 fehlt die erste Pst I-Spaltstelle und statt des 4,0 kbp großen Genstück hybridisiert ein 5,7 kbp-Fragment. Die Spaltstelle hierfür liegt nicht mehr im Hind III L Fragment, sondern im "Inverted Repeat" (IR) -Segment des BHV1-Genoms. Beim Muster 3 ging auch die zweite Pst I Spaltstelle verloren, so daß das 5,7 kbp- und das 1,8 kbp-Fragment verschmolzen und nur noch ein 7,5 kbp großes Segment übrigblieb (Abb.9).

Die Southern-blot-Hybridisierung stellt im Vergleich zur Restriktionsenzymanalyse (Endonuklease Fingerprinting) ein arbeitsaufwendigeres, aber viel sensibleres Verfahren dar. Die Unterscheidung der drei Muster war mit der einfacheren

Enzymanalyse nicht möglich.

Die Gensonde pEO scheint sich als biologischer Marker bei Untersuchungen zur Epidemiologie zu eignen. Mit dieser Methode ist die Möglichkeit gegeben, bekannte Virusstämme voneinander, bzw. einige Feldvirusstämme vom bekannten Impfstamm zu unterscheiden.

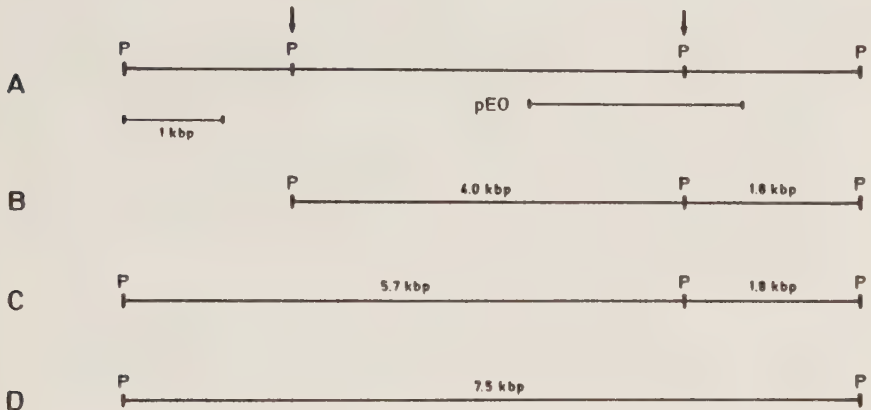


Abb.9: Zustandekommen der unterschiedlichen Restriktionsmuster:

P: Pst I-Spaltstelle

A: Teil des Hind III L- und des IR-Fragments des BHV1-Genoms

B: Muster 1 (alle Pst I-Spaltstellen erhalten)

C: Muster 2 (eine Pst I-Spaltstelle verloren)

D: Muster 3 (zwei Pst I-Spaltstellen verloren)

6. Zusammenfassung

Besamungsbullen waren auf ihren BHV1-Immunstatus und -mittels medikamenteller Immunsuppression - auf BHV1-Ausscheidung untersucht worden. Von den Altbullen waren 65,45 % seropositiv, von den Jungbullen 21,05 %. Vierzehn der insgesamt 845 untersuchten Tiere schieden spontan Virus aus. Nach Immunsuppression konnte bei 26 von 81 seropositiven Bullen Virus isoliert werden. Die Virusausscheidung erfolgte vorwiegend über den Respirationstrakt, die Ausscheidungstitere waren niedriger als bei einer Erstinfektion.

Alle Virusisolate wurden als BHV1 identifiziert, andere Erreger wurden nicht gefunden.

Bei einer weiteren Immunsuppression mit Rindern der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen gelang die Reaktivierung von BHV1 bei 6 von 7 Tieren.

Die nähere Charakterisierung der BHV1-Isolate erfolgte mittels Restriktionsenzymanalyse und Southern-blot-Hybridisierung mit der im Hause hergestellten Gensonde pEO. Mittels Hybridisierung nach Pst I-Spaltung wurden in Virusisolaten von Besamungsbullen 2 und in 21 BHV1-Stämmen 3 unterschiedliche Restriktionsmuster gefunden.

Die unterschiedlichen Muster erklären sich aus dem Verlust von Pst I-Spaltstellen in diesem Genabschnitt. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um Punktmutationen, die auf die Genexpression keinen Einfluß haben. Weitere Untersuchungen mit BHV1-Isolaten nach Gewebekultur- und Tierpassagen zeigten die Stabilität der Mutationen.

Aus den Tatsachen, daß in den Isolaten der Besamungsbullen immer nur ein Muster gefunden wurde, und daß alle BHV1-Isolate von geimpften Tieren das gleiche Muster zeigten wie der Impfstamm, konnte geschlossen werden, daß die vakzinieren Bullen gegen Feldvirusinfektionen weitgehend geschützt waren.

Gegenüber der Restriktionsenzymanalyse erwies sich die arbeitsaufwendigere Southern-blot-Hybridisierung als spezifischeres Verfahren. Diese Methode ermöglichte die Differenzierung von BHV1-Stämmen und bei den BHV1-Isolaten eine gewisse Unterscheidung zwischen Impf- und Feldvirus.

7. Summary

Experiments to identify and characterize bovine herpesvirus type 1 (BHV1) -isolates

At first the presence or absence of antibodies against BHV1 in bulls of an artificial insemination center was determined. Seropositive bulls were then immunosuppressed and checked for virus excretion.

From the older animals 65,45 per cent were seropositive, from the younger ones only 21,05 per cent. In 14 of the total of 845 bulls virus could be recovered without treatment. Following immunosuppression 26 of 81 become virus positive. Most animals shed virus from the respiratory tract. The highest titers were still lower than those obtained after a first infection.

All viral isolated proved to be BHV1, no other agents were recovered.

When 7 seropositive cattle owned by the Federal Research Center Tübingen were immunosuppressed, virus isolations were possible in 6 of them.

The BHV1 isolates were further characterized by restriction enzyme analysis and Southern blot hybridisation using the genetic probe pEO. Following digestion with Pst I and hybridisation two different DNA patterns were detected in the isolates from the AI center and three different ones when 21 BHV1 strains were checked. The differences in the pattern were due to a loss of Pst I recognition sites in this portion of the genome. These are obviously point mutations that do not influence gene expression. It could also been shown that tissue and animal passages did not alter the pattern.

It was also found that the pattern of all of the isolates from bulls vaccinated with an attenuated live vaccine were identical with the one of the vaccine strain. It can

therefore be concluded that the bulls were fairly well protected against field virus infection.

By comparing restriction enzyme analysis and Southern blot hybridisation it was found that the hybridisation although more laborious proved to be more specific, because it was possible to demonstrate differences among BHV1 strains and between vaccine and field virus to a certain extent.

8. Literaturverzeichnis

1. Ackermann, M. and Wyler, R. (1984)
The DNA of an IPV strain of bovid herpes virus 1 in
sacral ganglia during latency after intravaginal
infection.
Vet.Microbiol. 9, 53-63
2. Bagust, T.J. (1972)
Comparison of the biological, biophysical and antigenetic
properties of four strains of infectious bovine rhino-
tracheitis herpesvirus.
J.comp.Pathol. 82, 365-374
3. Bocciarelli, D.S., Orfei, U., Mondino, G. and Persechino,
A. (1966)
The core of a bovine herpesvirus.
Virology 30, 58-61
4. Bowling, C.P., Goodheart, C.R. and Plummer, G. (1969)
Oral and genital bovine herpesviruses.
J.Virol. 3, 95-97
5. Buening, G.M. and Gratzek, J.B. (1967)
Comparison of selected characteristics of four strains of
infectious bovine rhinotracheitis virus.
Am.J.Vet.Res. 28, 1257-1267
6. Bush, C.E. and Pritchett, R.F. (1985)
A comparison of the genomes of bovine herpesvirus type 1
and pseudorabies virus.
J.Gen.Virol. 66, 1811-1817

7. Castrucci, G., Wada, E.M., Ranucci, S., Frigeri, F., Cilli, V., Pedini, B., Tesei, B. and Arush, M.A. (1980)
Reactivation of latent infection by infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle.
Microbiologica 3, 307-318
8. Castrucci, G., Frigeri, F., Ranucci, S., Ferrari, M., Cilli, V., Pedini, B., Nettleton, P., Caleffi, F. and Aldrovani, V. (1984)
Comparative studies of strains of infectious bovine rhinotracheitis virus isolated from latently infected calves.
Comp.Immun.Microbiol.infect.Dis. 7, 1-10
9. Chapman, M.S., Lucas, M.H., Herbert, C.N. and Goodney, R.G. (1979)
Survival of infectious bovine rhinotracheitis virus in stored frozen semen.
Vet.Science Communication 3, 137-139
10. Davies, D.H. and Duncan, J.R. (1974)
The pathogenesis of recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus induced in calves by treatment with corticosteroids.
Cornell Vet. 64, 340-366
11. Eiler, A.-S. (1987)
Zur Problematik geeigneter und praktikabler Grenzwerte (cut-off-Werte) in der Diagnostik der Infektiösen bovinen Rhinotracheitis (IBR/IPV) mittels ELISA.
Inaugural-Dissertation, München
12. Engels, M., Steck, F. and Wyler, R. (1981)
Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis.
Arch.Virol. 67, 169-174

13. Engels, M., Giuliani, C., Wild, P., Beck, T.M., Loepfe, E. and Wyler, R. (1986)
The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenetic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and crosshybridization.
Virus Research 6, 57-73
14. Espinasse, J., Viso, M., Laval, A., Layec, C.le and Monpetit, C. (1983)
Reactivation and shedding of infectious bovine rhino-tracheitis virus caused by 3-methylindole.
Vet.Rec. 113, 15-16
15. Gillespie, J.H., McEntee, K., Kendrick, J.W. and Wagner, H.C. (1959)
Comparison of infectious pustular vulvovaginitis virus with infectious bovine rhinotracheitis.
Cornell Vet. 49, 288-297
16. Graham, B.J., Ludwig, H., Bronson, D.L., Benjesh-Melnik, M. and Biswal, N. (1972)
Physiochemical properties of the DNA of herpesviruses.
Biochem. Biophys. Acta 259, 13-23
17. Gregersen, J.P. und Wagner, K. (1985)
Bovine herpesvirus 1 live vaccine causes persistent infection of the genital tract with spontaneous shedding of virus in the semen.
in: "Immunity to herpesvirus infections of domestic animals", Pastoret, Thiry, Saliki (eds.), CEC Luxembourg
18. Gregersen, J.-P., Pauli, G. und Ludwig, H. (1985)
Bovine Herpesvirus 1: Differentiation of IBR- and IPV-viruses and idendification and functional role of their major immunogenetic components.
Arch.Virol. 84, 91-103

19. Gründer, H.D., Reuleaux, I.R., und Liess, B. (1960)
Feststellung der virusbedingten Rhinotracheitis
infectiosa des Rindes. Herkunft und Isolierung des Virus.
Dtsch.tierärztl.Wochenschr. 67, 514-519

20. Haas, L. und Kaaden. O.-R. (1987)
Nukleinsäurehybridisierung in der virologischen
Diagnostik: Grundlagen und Ausblicke.
Tierärztl.Umschau 42, 855-863

21. Hammerschmidt, W., Ludwig, H. and Buhk, H.J. (1986)
Short repeat cause heterogeneity at genomic terminus of
bovine herpesvirus 1.
J.Virol. 58, 43-49

22. Hayward, G.S., Frenkel, N., Roizman, B. (1975)
Anatomy of herpes simplex virus DNA: Strain differences
and heterogeneity in locations of restriction
endonuclease cleavage sites.
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 72, 1768-1772

23. Homan, E.J. and Easterday, B.C. (1980)
Isolation of bovine herpesvirus-1 from trigeminal ganglia
of clinically normal cattle.
Am.J.Vet.Res. 41, 1212-1213

24. Homan, E.J. and Easterday, B.C. (1981)
Further studies of naturally occurring latent bovine
herpesvirus infection.
Am.J.Vet.Res. 42, 1811-1813

25. Johnston, L.A.Y., Simmons, G.C. and McGavin, M.D. (1962)
A viral meningoencephalitis in calves.
Aust.Vet.J. 38, 207-215

26. Kaaden, O.-R. (1985)
Gentechnologie in der Veterinärmedizin.
Tierärztl.Umschau 40, 998-1005

27. Kärber, G. (1931)
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer
Reihenversuche.
Arch.Exp.Path.Pharmak. 162, 480-483

28. Kokles, R. (1979)
Die Anwendung von Prednisolon zur Feststellung der
Lokalisation des IBR/IPV Virus im Rinderorganismus und
zur Objektivierung des Vakzinationseffektes.
Mh.Vet.-Med. 34, 724-731

29. Lema, B., Kokles, R. und Brüsehaber, H.-U. (1981)
Untersuchungen zur Persistenz des IBR/IPV-Virus bei
latent infizierten Rindern nach Immunisierung mit
IBR-Lebendvirusvakzine.
Mh.Vet.-Med. 36, 130-133

30. Ludwig, H. (1972)
Untersuchungen am genetischen Material von Herpesviren
I. Biophysikalisch chemische Charakterisierung von
Herpesvirus-Desoxyribonukleinsäuren.
Med.Microbiol.Immunol. 157, 186-211

31. Ludwig, H. (1982)
Bovine Herpesviruses.
in "The Herpesviruses" (Ed. B. Roizman)
Plenum Press, New York and London

32. Madin, S.H., York, C.J. and McKercher, D.G. (1956)
Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus.
Science 124, 721-722

33. Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B., Wittmann, G.
(1977)
Virologische Arbeitsmethoden. Band II
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

34. Mayr, A., Eißner, G., Mayr-Bibrack, B. (1984)
Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin.
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

35. Mayr, A. (1988)
Pathogenese und Bekämpfung von Herpesvirusinfektionen
beim Nutztier.
Tierärztl.Umschau 43, 4-11
36. McKercher, D.G., Madin, S.H. and Kendrick, J.W. (1957)
Infectious bovine rhinotracheitis a newly recognized
virus disease of cattle.
Am.J.Vet.Res. 18, 246
37. McKercher, D.G., Straub, O.C., Saito, J.K. and Wada, E.M.
(1959)
Comparative studies of the etiological agents of
infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular
vulvovaginitis.
Canad.J.comp.Med. 23, 320-328
38. McKercher, D.G., Wada, E.M. and Straub, O.C. (1963)
Distribution and persistence of infectious bovine
rhinotracheitis virus in experimentally infected cattle.
Am.J.Vet.Res. 24, 510-514
39. McKercher, D.G. and Wada, E.M. (1964)
The virus of infectious bovine rhinotracheitis as a cause
of abortion in cattle.
J.Amer.vet.med.Ass. 144, 136-142
40. Metzler, A.E., Matile, H., Gassmann, U., Engels, M. and
Wyler, R. (1985)
European isolates of bovine herpesvirus 1: A comparison
of restriction endonuclease sites, polypeptides, and
reactivity with monoclonal antibodies.
Arch.Virol. 85, 57-69
41. Metzler, A.E., Schudel, A.A. and Engels, M. (1986)
Bovine herpesvirus 1: Molecular and antigenic
characteristics of variant viruses isolated from calves
with neurological disease.
Arch.Virol. 87, 205-217

42. Meyer, H., Mayr, A., Bachmann, P.A., Bernardi, G. und Wagner, H. (1985)
Schutzimpfung von latent IBR-IPV-Virus infizierten Bullen mit einer Vakzine aus inaktiviertem IBR-Virus.
Tierärztl.Umschau 40, 974-985
43. Misra, V., Babiuk, L.A. and Le Q. Darcel, C. (1983)
Analysis of bovine herpesvirus-type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting.
Arch.Virol. 76, 341-354
44. Msolla, P.M., Allan, E.M., Selman, I.E. and Wiseman, A. (1983)
Reactivation and shedding of bovine herpesvirus 1 following Dictyocaulus viviparus infection.
J.comp.Path. 93, 271-274
45. Nahmias, A.J. and Dowdle, W.R. (1968)
Antigenetic and biologic differences in herpesvirus hominis.
Prog.med.Virol. 10, 110-159
46. Narita, M., Inui, S., Nanba, K. and Shimizu, Y. (1978)
Neural changes in recurrent infection of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves treated with dexamethasone.
Am.J.Vet.Res. 39, 1399-1403
47. Narita, M., Inui, S., Yabuki, Y., Nanba, K. and Shimizu, Y. (1979)
Neural changes in recurrent genital infection of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves treated with dexamethasone.
Br.J.exp.Path. 60, 111-119

48. Narita, M., Inui, S., Nanba, K. and Shimizu, Y. (1981)
Recrudescence of infectious bovine rhinotracheitis virus
and associated neural changes in calves treated with
dexamethasone.
Am.J.Vet.Res. 42, 1192-1197

49. Narita, M., Inui, S., Nanba, K. and Shimizu, Y. (1983)
Detection of virus particles in trigeminal ganglion cells
in a calf recurrently infected with infectious bovine
rhinotracheitis virus.
Jap.J.Vet.Sci. 45, 691-693

50. Nettleton, P.F. and Sharp, J.M. (1980)
Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after
vaccination.
Vet.Rec. 107, 379-384

51. Nettleton, P.F., Sharp, J.M., Herring, A.J. and
Herring, J.A. (1984)
Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after
vaccination, challenge and immunosuppression.
in "Latent Herpesvirus Infections in Veterinary Medicine"
Wittmann, G., Gaskell, R.M. and Rziha, H.-J. (eds.)
Martinus Nijhoff Publishers, pp 191-210

52. Osorio, F.A., Reed, D.E., van der Maaten, M.J., Metz,
C.A., (1985)
Comparison of the herpesviruses of cattle by DNA restric-
tion endonuclease analysis and serological analysis.
Am.J.Vet.Res. 46, 2104-2109

53. Pastoret, P.-P., Aguilar-Setién, A., Burtonboy, G.,
Lamy, M.E. and Schoenaers, F. (1978)
Comparison of several strains of infectious bovine
rhinotracheitis virus.
Abstracts International Virologie IV, The Hague, p. 526

54. Pastoret, P.-P. (1979)
Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovid Herpesvirus 1). Aspects biologiques et moléculaires.
Thèse, Université de Liège
55. Pastoret, P.-P., Aguilar-Setién, A., Burtonboy, G., Mager, J., Jetteur, P. and Schoenaers, F. (1979)
Effect of repeated treatment with dexamethasone on the reexcretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response.
Vet.Microbiol. 4, 149-155
56. Pastoret, P.-P., Jetteur, P., Aguilar-Setién, A., Leroy, P., Godart, M. and Schoenaers, F. (1979)
Etude par une méthode de comparaison de la moyenne des plages de souches du virus IBR (Bovid herpesvirus 1) isolées chez les bovins après injection de dexaméthasone.
Ann.Méd.Vét. 123, 203-207
57. Pastoret, P.-P., Burtonboy, G., Aguilar-Setién, A., Godart, M., Lamy, M.E. and Schoenaers, F. (1980)
Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus (Bovid herpesvirus 1), from respiratory and genital origins, using polyacrylamide gel electrophoresis of structural proteins.
Vet.Microbiol. 5, 187-194
58. Pastoret, P.-P., Babiuk, L.A., Misra, V. and Griebel, P. (1980)
Reactivation of temperature-sensitive and non-temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis virus with dexamethasone.
Inf.Imm. 29, 483-488

59. Pastoret, P.-P., Thiry, E., Brochier, B., Derboven, G. and Vindevogel, H. (1984)
The role of latency in the epizootiology of infectious bovine rhinotracheitis.
in: "Latent Herpesvirus Infections in Veterinary Medicine"
Wittmann, G., Gaskell, R.M. and Rziha, H.-J. (eds.)
Martinus Nijhoff Publishers, pp 211-227
60. Reisinger, L. und Reimann, H. (1928)
Beitrag zur Ätiologie des Bläschenausschlages des Rindes.
Wien.tierärztl.Monatsschr. 15, 249-261
61. Rolle, M. und Mayr, A. (1984)
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
62. Rossi, C.R. and Kiesel, G.K. (1982)
Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus immunisation on viral shedding in challenge-exposed calves treated with dexamethason.
Am.J.Vet.Res. 43, 1576-1579
63. Russel, W.C. and Crawford, L.V. (1964)
Properties of the nucleic acids from some herpes group viruses.
Virology 22, 288-292
64. Saxegaard, F. (1966)
Problems connected with the diagnosis of subclinical infection with infectious pustular vulvovaginitis virus (IPV-virus) in bulls.
Nord.Vet.Med. 18, 452-459
65. Saxegaard, F. (1970)
Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in cattle with particular reference to genital infections.
Vet.Bull. 40, 605-611

66. Schreurs, C. (1985)
Bovines Herpesvirus Typ 1: Genomvergleich eines
attenuierten Virusstammes und dessen virulentem
Ausgangsstamm.
Diplomarbeit, Bundesforschungsanstalt für
Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen
67. Schroeder, R.J. and Moys, M.D. (1954)
An acute upper respiratory infection of dairy cattle.
J.Amer.vet.med.Ass. 125, 471
68. Schwers, A., Pastoret, P.-P., Leroy, P., Vindevogel, H.,
Aguilar-Setién, A., Verheyden, A. (1980)
Sensibilité en phosphonoformate de différentes souches du
virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovine
Herpesvirus 1).
Ann.Méd.Vét. 124, 271-279
69. Schudel, A.A., Carillo, B.J., Wyler, R. and Metzler, A.E.
(1986)
Infections of calves with antigenic variants of bovine
herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease.
J.Vet.Med.B. 33, 303-310
70. Seal, B.S., St.Jeor, S.C. and Lee Taylor, R.E. (1985)
Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus 1
DNA and nucleic acid homology between isolates.
J.Gen.Virol. 66, 2787-2792
71. Sheffy, B.E. and Davies, D.H. (1972)
Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid
treatment.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 140, 974-976
72. Snowdon, W.A. (1965)
The IBR-IPV virus: reactivation to infection and
intermittent recovery of virus from experimentally
infected cattle.
Aust.Vet.J. 41, 135-142

73. Southern, E.M. (1975)
Detection of specific sequences among DNA-fragments
separated by gel electrophoresis.
J.Mol.Biol. 98, 503-518
74. Straub, O.C. und Böhm, H.O. (1964)
Untersuchungen über die Lokalisation und Persistenz des
Virus der infektiösen Rhinotracheitis und des Bläschen-
ausschlags in experimentell infizierten Rindern.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 77, 458-462
75. Straub, O.C., Matheka, H.D., Strohmaier, K. (1964)
Die Differenzierung des Virus der Rhinotracheitis (IBR)
vom Virus des Bläschenausschlags (IPV) durch die träger-
freie Virus-Zonenelektrophorese in einem Glukose-
Dichtegradienten.
Zbl.Vet.Med.B. 11, 565-571
76. Straub, O.C. (1966)
Bläschenausschlag und Sterilität beim Rind.
J.Andres-Bericht
IV. Tagung der Weltgesellschaft für Buiatrik, Zürich,
pp 535-538
77. Straub, O.C. (1972)
Die durch IBR-IPV-Viren hervorgerufenen Krankheiten beim
Rind und und ihre Bekämpfung mit einem neuen Lebendimpf-
stoff.
Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere,
Tübingen
78. Straub, O.C. (1977)
Erfahrungen bei der Bekämpfung der Infektiösen Bovinen
Rhinotracheitis (IBR) und der Infektiösen Pustulösen
Vulvovaginitis (IPV).
Tierärztl.Umschau 32, 107-112

79. Straub, O.C. (1977)
Die abwechslungsweise Verwendung von inaktiviertem und
attenuiertem Impfstoff zur Bekämpfung der infektiösen
Balanoposthitis (IBP) bei Besamungsbullen.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 90, 273-276
80. Straub, O.C. (1978)
Bovine Herpesvirusinfektionen.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
81. Straub, O.C. (1979)
Persistence of infectious bovine rhinotracheitis-
infectious pustular vulvovaginitis virus in the
respiratory and genital tract of cattle.
Comp.Immun.Microbiol.infect.Dis. 2, 285-294
82. Straub, O.C., Schmidt, B. und Liebke, H. (1982)
Ein Beispiel zur Sanierung IBR-IPV-Virus-verseuchter
Bestände.
Tierärztl.Umschau 37, 319-324
83. Straub, O.C. (1984)
The establishment of IBR-IPV virus latency in cattle
following the application of an inactivated IBR-IPV
vaccine.
in "Latent Herpesvirus Infections in Veterinary Medicine"
Wittmann, G., Gaskell, R.M. and Rziha, H.-J. (eds.)
Martinus Nijhoff Publishers, pp 241-250
84. Straub, O.C. (1986)
Über die Eignung eines Intrakutantests als diagnostisches
Hilfsmittel bei der Bekämpfung der durch BHV1 hervorgeru-
fenen Krankheiten.
Praktischer Tierarzt 67, 1043-1048
85. Straub, O.C. (1988)
Probleme und Erfahrungen bei der Bekämpfung der BHV1-
Infektionen.
collegium veterinarium XVIII, 58-60

86. Thiry, E., Saliki, J., Schwers, A. and Pastoret, P.-P.
(1985)
Parturition as a stimulus of IBR virus reactivation.
Vet.Rec. 116, 599-600

87. Watrach, A.M. and Bahnemann, H. (1966)
The structure of infectious bovine rhinotracheitis virus.
Arch.Virusforsch. 18, 1-7

88. Whetstone, C.A., Wheeler, J.G. and Reed, D.E. (1986)
Investigation of possible vaccine-induced epizootics of
infectious bovine rhinotracheitis, using restriction
endonuclease analysis of viral DNA.
Am.J.Vet.Res. 47, 1789-1795

89. Wittmann, G., Gaskell, R.M. and Rziha, H.-J. (eds) (1984)
Latent Herpesvirus Infections in Veterinary Medicine.
Martinus Nijhoff Publishers
Boston, The Hague, Dordrecht, Lancaster
for the Commission of the European Communities

90. Ziegenhagen, T. (1977)
Erhebungen zur Bekämpfung der IPV-Virusinfektion in
norddeutschen Besamungsstationen.
Inaugural Dissertation, TiHo, Hannover

91. Zwingmann, W. (1988)
Die BHV1-Problematik im Land Nordrhein-Westfalen:
Möglichkeiten des Schutzes von Rinderbeständen vor BHV1-
Infektionen und der Schaffung BHV1-freier Rinderbestände.
Tierärztl.Umschau 43, 308-311

Lebenslauf

Thomas Graf, geboren am 21.7.1959 in Burglengenfeld

1965 - 1969 Grundschule in Burglengenfeld

1969 - 1978 Gymnasium in Burglengenfeld

1978 - 1979 Wehrdienst

1980 - 1986 Studium der Veterinärmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

1986 Approbation

1986 - 1988 Doktorand und wissenschaftlicher Mit-
arbeiter an der Bundesforschungsanstalt
für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen

Herrn Prof. Dr. O. C. Straub danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr bin ich für die Übernahme der Arbeit zur Vorlage bei der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München sehr zu Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Keil und seiner Arbeitsgruppe für die Überlassung der Gensonde, die Einführung in die Southern-blot-Technik sowie die ständige Kooperationsbereitschaft.

Den Technischen Assistentinnen: Frau G. Kuebart, Frau H. Ludwig und Frau S. Weidemann danke ich an dieser Stelle für die Hilfsbereitschaft und das herzliche Arbeitsklima.

Für die Erstellung der Bilder und Zeichnungen danke ich Herrn P. Schröter und Herrn R. Straub.

